



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Expresión de las isoformas de la Rubisco activasa en hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) y su implicación en la actividad de la Rubisco

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
FRIDA HAIDÉ BELMONT FLORES

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR Departamento de Bioquímica

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS Departamento de Bioquímica
DR. JORGE RAMÍREZ SALCEDO Instituto de fisiología celular

Ciudad de México. enero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Estela Sánchez Quintanar, directora del proyecto, quien me aceptó en su laboratorio y me brindó las herramientas para la realización de este proyecto.

A mi madre, María Eugenia Flores, quien me ha apoyado en todo lo que emprendo y me ha motivado a culminar esta etapa en mi vida.

A Kevin quien a lo largo del posgrado, y a la fecha, me ha apoyado en la realización y revisión de este trabajo.

A Lilia Bernal, a Raúl Aguilar y a mis compañeros del laboratorio 103 por el apoyo y los valiosos conocimientos que me transmitieron.

A Impulsora Agrícola, S.A. de C.V. (convenio FQ-10-052) quien proporcionó las semillas empleadas para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. de apoyo 333576) durante el tiempo que estuve inscrita en el posgrado.

A los miembros del comité tutor, los Doctores Eleazar Martínez Barajas Y Jorge Ramírez Salcedo, quienes a lo largo del proyecto de investigación me ayudaron con su críticas, ideas y palabras de aliento.

A los miembros del jurado por las valiosas observaciones sobre mi proyecto de tesis que fueron fundamentales para el resultado final del escrito. Los integrantes del jurado son:

Presidente	Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Vocal	Jorge Nieto Sotelo
Vocal	Marina Gavilanes Ruiz
Vocal	Berenice García Ponce de León
Secretario	Francisco Javier Plascencia de la Parra

Contenido

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
3	ANTECEDENTES	5
3.1	Fase luminosa de la FOTOSÍNTESIS	5
3.2	Fase de las reacciones del carbono	9
3.3	Metabolismo C ₃ , C ₄ y CAM.....	11
3.4	Rubisco	13
3.5	Rubisco activasa	14
3.6	Regulación de la Rubisco activasa y del ciclo de BBC.....	17
3.7	La cebada en México y el mundo	19
4	HIPÓTESIS	25
5	OBJETIVOS	25
6	METAS	25
7	METODOLOGÍA.....	26
7.1	Material Biológico.....	26
7.2	Extracción de Proteínas	27
7.3	Cuantificación del contenido de LA Rubisco activasa	28
7.4	Extracción de RNA	29
7.5	Cuantificación de RNA	29
7.6	Determinación de la cantidad de mensajeros de la Rubisco activasa.....	29
7.7	Ensayo de actividad de la Rubisco	31
7.8	Cuantificación de Clorofila.....	32
7.9	Análisis estadístico.....	33
8	RESULTADOS	34
8.1	La expresión de La Rubisco activasa cambia en función de la etapa de desarrollo	34
8.2	Los niveles de los RNA mensajeros de la Rubisco activasa varían en las distintas hojas analizadas	35
8.3	Ensayo de actividad de la Rubisco	37
8.4	Cantidad de clorofila.....	37
8.5	Análisis de correlación entre datos.....	38
9	DISCUSIÓN.....	41
10	CONCLUSIONES	47

11	ANEXO I	48
12	ANEXO II	50
13	ANEXO III	51
13.1	Datos generados en la cuantificación de proteínas	51
13.2	Cuantificación de RNAs.....	55
13.3	Cuantificación de la actividad de la Rubisco	58
13.4	Cuantificación de la Clorofila	60
14	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 RESUMEN

La creciente producción de gases de efecto invernadero ha propiciado cambios importantes en el ambiente, los cuales traen consigo efectos dañinos que a mediano plazo podrían propiciar el desabasto mundial de alimentos. Los 4 cereales con mayor producción a nivel mundial son maíz, arroz, trigo y cebada. La cebada tiene gran impacto económico en México, ya que además de emplearse como forraje es la materia prima para la producción de cerveza y nuestro país es el principal exportador de ésta a nivel mundial. Nuestro grupo de trabajo, preocupado por la seguridad alimentaria y el desarrollo del país, se ha enfocado en estudiar cereales con gran importancia nacional con la finalidad de conseguir ejemplares más productivos o tolerantes a las condiciones adversas del ambiente. Las plantas obtienen el carbono necesario para la síntesis de materia orgánica del dióxido de carbono del aire mediante el ciclo de Benson-Bassham-Calvin (BBC) de la fotosíntesis por la acción de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). La Rubisco requiere la presencia de la chaperona molecular ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa activasa (Rubisco activasa, Rca) para su activación. En cebada hay dos genes que codifican para la Rubisco activasa (*RcaA* y *RcaB*) que generan en conjunto 3 transcritos (*RcaA1*, *RcaA2* y *RcaB*) para 3 proteínas, dos de 42 kDa y una de 46 kDa. El objetivo de este trabajo fue determinar si en diferentes etapas del desarrollo de plantas de cebada, de una variedad de temporal de seis hileras, existe variación en la cantidad de cada una de las isoformas de la Rubisco activasa, a nivel de mRNA y de proteína, así como conocer si hay una asociación entre éstas y la actividad de la Rubisco. Los resultados indican que el contenido total de la Rubisco activasa no varía entre las distintas etapas analizadas pero sí lo hace la isoforma de 46 kDa. Se determinó que existe asociación entre la cantidad de la isoforma de la Rca de 46 kDa y la actividad de la Rubisco.

2 INTRODUCCIÓN

La concentración de CO₂ atmosférico se ha incrementado a lo largo de los años. Se estima que en los últimos 800,000 años la concentración ha cambiado de 180 ppm (en los periodos glaciares) a 280 ppm (en los periodos interglaciares) y actualmente a 384 ppm luego de la industrialización, a la par que la temperatura media mundial se ha elevado (DaMatta et al. 2010).

El IPCC (Panel Intergubernamental en Cambio Climático, por sus siglas en inglés) es una organización que se creó en 1988 con la finalidad de preparar estimaciones en todos los aspectos del cambio climático y predecir su impacto en el medio ambiente, con miras a formular estrategias de respuesta realistas. La organización ha emitido 4 reportes desde 1997 —se espera un quinto para el 2022— en los que se proponen posibles escenarios mundiales con relación a la temperatura y concentraciones de gases atmosféricos. En el último reporte (2014) muestran proyecciones hasta el año 2100 en 4 escenarios distintos (TRC2.6, TRC4.5, TRC6.0, TRC8.5) que pueden o no ocurrir dependiendo de las acciones que se tomen a nivel mundial para frenar los efectos adversos de la industrialización en la que vivimos. El escenario en el que se toman las mejores acciones posibles es TRC2.6 y el escenario en el que las cosas continúan como hasta ahora —sin frenar las emisiones de CO₂— sería TRC8.5 (Figura 1).

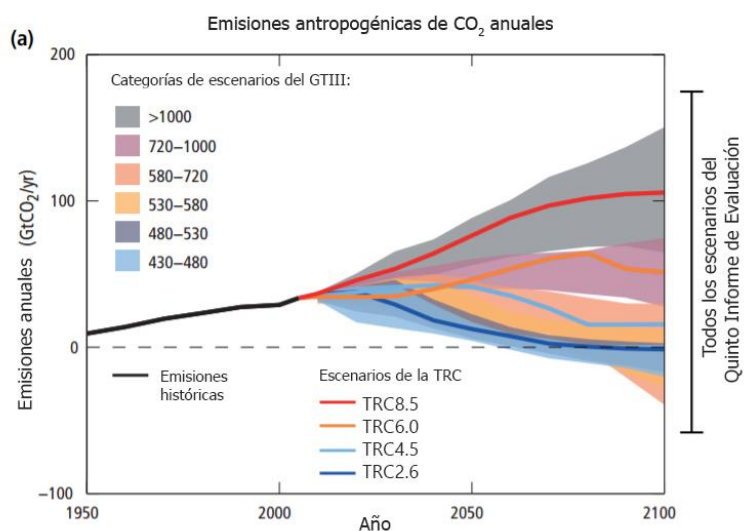


Figura 1 4 proyecciones de las emisiones de CO₂ causadas por el hombre a lo largo del siglo XXI.

Cada TRC alcanza un pico máximo de gases de efecto invernadero (GEI). TRC2.5 lo asume entre los años 2010 y 2020, TRC4.5 alrededor de 20140, TRC6.0 alrededor de 2080 y en TRC8.5 los GEI continúan en aumento durante todo el siglo XXI. (IPCC, 2014)

TRC= Trayectoria representativa de concentración o Representative concentration pathway.

GTIII=Grupo de trabajo III,

GtCO₂/yr= Gigatoneladas de CO₂ por año,

las categorías de los escenarios representan la estimación media en ppm de CO₂ en el año 2100.

En el escenario TRC2.6 se espera que el CO₂ promedio ambiental alcance concentraciones de 430 a 480 ppm y la temperatura se incremente entre 0.3°C y 0.7°C —respecto al periodo 1986-2005—, mientras que en el escenario TRC8.5 podrían alcanzarse concentraciones superiores a las 1000 ppm de CO₂ promedio e incremento en la temperatura entre 2.6°C y 4.8°C (Figura 2). Además del cambio en la concentración de CO₂ y la temperatura se prevén cambios en el volumen, frecuencia y distribución de las precipitaciones alrededor del mundo, tanto que en el escenario TRC8.5 se prevé que disminuirá el volumen global de los glaciares hasta en 85% que podría conducir a un incremento en el nivel del mar de hasta 0.82 m (IPCC, 2014).

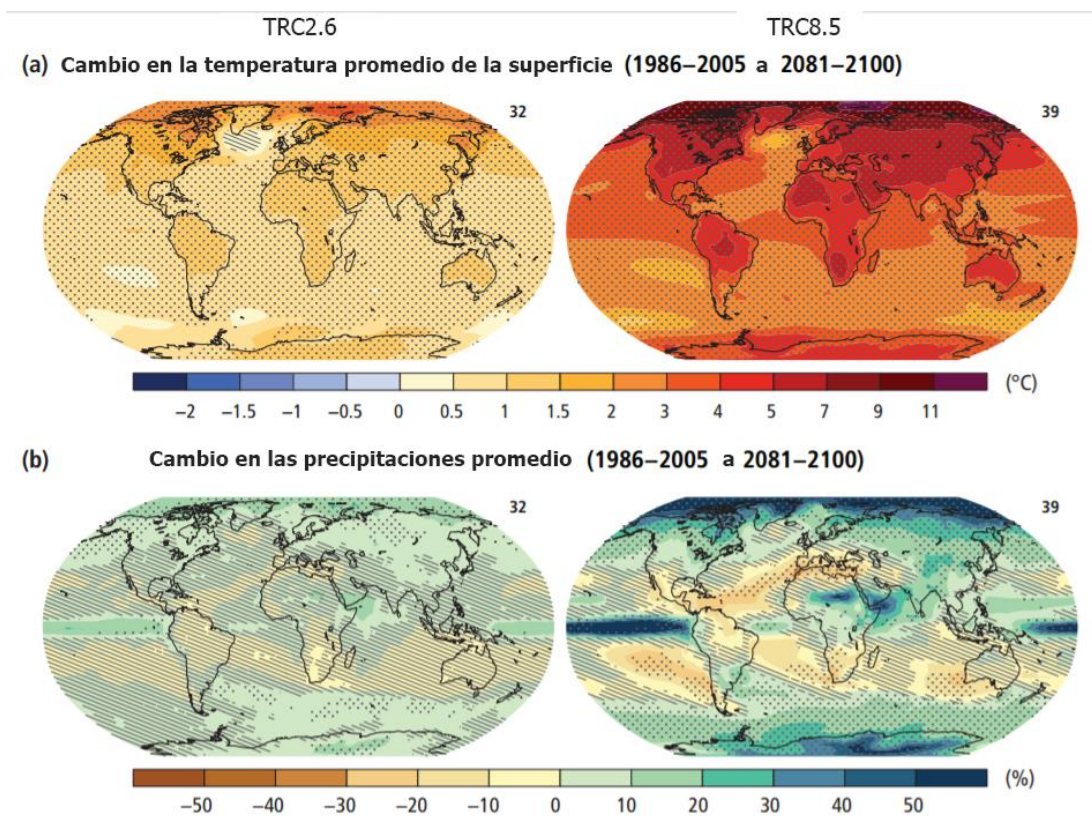


Figura 2 Cambios en la temperatura promedio (a) y cambio en la precipitación promedio (b) basados en proyecciones multi-modelo para 2081-2100 respecto a 1986-2005 bajo los escenarios TRC2.6, izquierda, y TRC8.5, derecha. El número de modelos empleados para la media se indica en la esquina superior derecha de cada panel. El puntillado representa regiones donde el cambio proyectado es grande en comparación con la variabilidad natural interna y donde al menos 90% de los modelos concuerdan en sus predicciones. Las rayas diagonales muestran regiones donde el cambio proyectado es menor a una desviación estándar de la variación natural interna (IPCC, 2014)

El estudio y predicción de cambios climáticos a largo plazo genera datos importantes que deben ser tomados en cuenta para asegurar la seguridad alimentaria. La ingesta de plantas es fundamental en la dieta del hombre ya sea por su consumo directo —al proporcionar entre el 40% y el 60% de la energía diaria requerida (FAO, 1998 y 2003)—, o indirecto al consumir

animales —aproximadamente la mitad de la producción mundial de granos es destinada para la alimentación del ganado (IAASTD, 2009). El incremento en la concentración de los gases de efecto invernadero puede propiciar el desabasto mundial de alimentos (IPCC, 2014), y es por ello por lo que existe gran preocupación en desarrollar plantas tolerantes a condiciones adversas y en conocer los mecanismos de regulación de la fotosíntesis, entre otros aspectos. Para predecir la supervivencia y desarrollo de las plantas en los siguientes años, se han llevado a cabo experimentos en los que se hacen crecer plantas en ambientes modificados con temperaturas reguladas y mayor contenido de CO₂ —mediante la técnica de FACE (Free-air concentration enrichment/ Enriquecimiento de CO₂ al aire libre)— y se ha encontrado que se contrarrestan parcialmente los efectos negativos del incremento de temperatura con el aumento en la fijación de carbono (Derner et al. 2003; Long et al. 2006; Deryng et al. 2016); pero también se ha observado disminución en la cantidad de nitrógeno en las hojas (Ainsworth & Long, 2005) que puede conducir a menor contenido de proteína en granos en hasta 14% (Taub y Wang, 2008). El aumento del CO₂ ambiental podría favorecer el incremento en el rendimiento de las plantas hasta en un 10% —en el mejor escenario— o no, si las condiciones climáticas son extremas, y en cuyo caso podría apreciarse una disminución cercana al 30% (Parry et al. 2004).

Las plantas son organismos sensibles a factores ambientales, tales como luz, temperatura, humedad, gases, y dependiendo de la combinación de éstos (y otros no citados) es como se desarrollarán. Para la síntesis de sus azúcares éstas realizan primeramente un proceso llamado fotosíntesis del cual surge el precursor para la síntesis de glucosa.

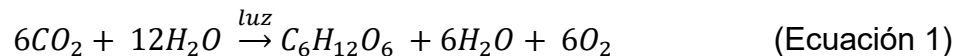
Una de las proteínas más estudiadas, por la relevancia que tiene en el proceso, es la enzima Rubisco quien cataliza la fijación de CO₂ atmosférico en un azúcar de 5 carbonos. La chaperona molecular Rubisco activasa es la proteína responsable de la activación de la Rubisco (Heldt & Piechulla, 2011)

3 ANTECEDENTES

3.1 FASE LUMINOSA DE LA FOTOSÍNTESIS

El proceso de convertir la radiación electromagnética en energía química se denomina fotosíntesis. Existen dos tipos de fotosíntesis, la anoxygenica y la oxygenica (Gest, 1993). La fotosíntesis anoxygenica es aquella en la que compuestos azufrados (S^- , S^0 o $S_2O_3^-$) o hidrógeno (H_2) sirven como donadores de electrones (y no el agua, como ocurre en la fotosíntesis oxygenica) y por lo tanto no se produce O_2 como ocurre en el caso de la fotosíntesis oxygenica.

La ecuación global de la fotosíntesis oxygenica es:



Muchos organismos son capaces de realizar fotosíntesis. Dentro del grupo de los procariontes, las bacterias púrpuras, las bacterias verdes sulfurosas, las bacterias verdes no del azufre y las heliobacterias realizan fotosíntesis anoxygenica; las cianobacterias son los únicos procariontes capaces de realizar fotosíntesis oxygenica. Diversos eucariontes realizan fotosíntesis, como algas verdes, algas rojas, glaucofitas, cromofitas, criptofitas, dinofitas y plantas (Blankenship, 2002) .

El principal interés de este trabajo es la fotosíntesis oxygenica que realizan las plantas, por lo que de ahora en adelante al hablar de fotosíntesis se estará haciendo mención a la fotosíntesis oxygenica en plantas.

Todas las reacciones de la fotosíntesis se llevan a cabo en el cloroplasto, aunque no todas se llevan a cabo en la misma estructura del cloroplasto. En la Figura 3 se muestra un esquema de la localización del cloroplasto en una hoja, así como la distribución de sus diversos componentes. El proceso de fotosíntesis consta de dos fases: la fase luminosa y la fase de las reacciones del carbono, antes llamada fase oscura. Las reacciones de la fase luminosa tienen lugar en la membrana tilacoidal de los cloroplastos mientras que las del carbono se llevan a cabo en el estroma.

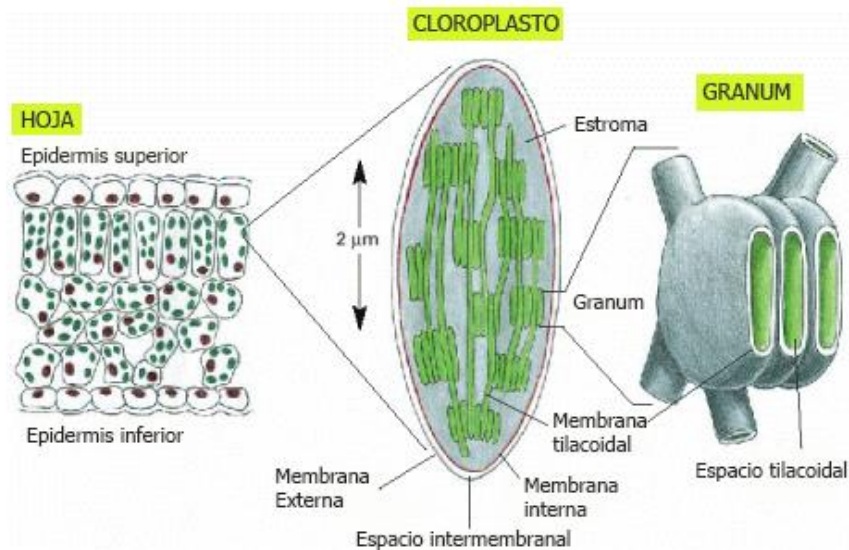


Figura 3 Estructura y localización de los cloroplastos en una hoja

El cloroplasto es un organelo fotosintético que contiene tres membranas distintas (externa, interna y tilacoidal) que definen tres compartimentos internos separados (intermembranal, estroma y tilacoidal). Al conjunto de tilacoides se les llama grana, la unión entre granas se da mediante las lamelas. (Alberts y otros, 2002)

El desarrollo de las reacciones de la fase luminosa se lleva a cabo, en gran medida, por la presencia de clorofilas (pigmentos verdes con estructura de magnesio-porfirinas que actúan como receptores de la energía lumínica) dada su capacidad de transferir electrones.

El fotosistema II (PSII) es un complejo transmembranal homodimérico ubicado en la membrana del tilacoide. Cada dímero contiene un complejo central compuesto por 4 subunidades intrínsecas grandes, 12 subunidades transmembranales de bajo peso molecular, y 4 subunidades extrínsecas conectadas en la superficie luminal; en la región externa del complejo central se encuentra un trímero del complejo recolector de luz II (LHCII) y otros dos monómeros recolectores de luz. Con cada monómero se han visto asociadas 105 clorofilas, 28 carotenos, 1 grupo hemo, un cúmulo de Mn_4O_5Ca , 1 plastoquinona y varios lípidos (Wei et al. 2016). El LHCII capta la energía luminosa y la transfiere al centro de reacción (RC) (Liu et al. 2004). En el RC hay un conjunto de pigmentos que recibe el nombre de 'P680', en éste hay una subunidad proteica llamada D1 asociada a una clorofila que al ser excitada por el LHCII cede un electrón a una molécula de feofitina aceptora (Ph) de modo que el P680 se oxida ($P680^{*+}$) y se produce la separación de carga eléctrica que genera la fuerza reductora del sistema. La feofitina reducida transfiere el electrón a una primera quinona aceptora (QA) que a su vez lo transfiere a una segunda quinona (QB) que reduce a un grupo de quinonas llamadas plastoquinonas (PQ) para generar plastoquinol (PQH_2) al tomar dos H^+ del estroma (Figura 4) (Govindjee et al. 2010).

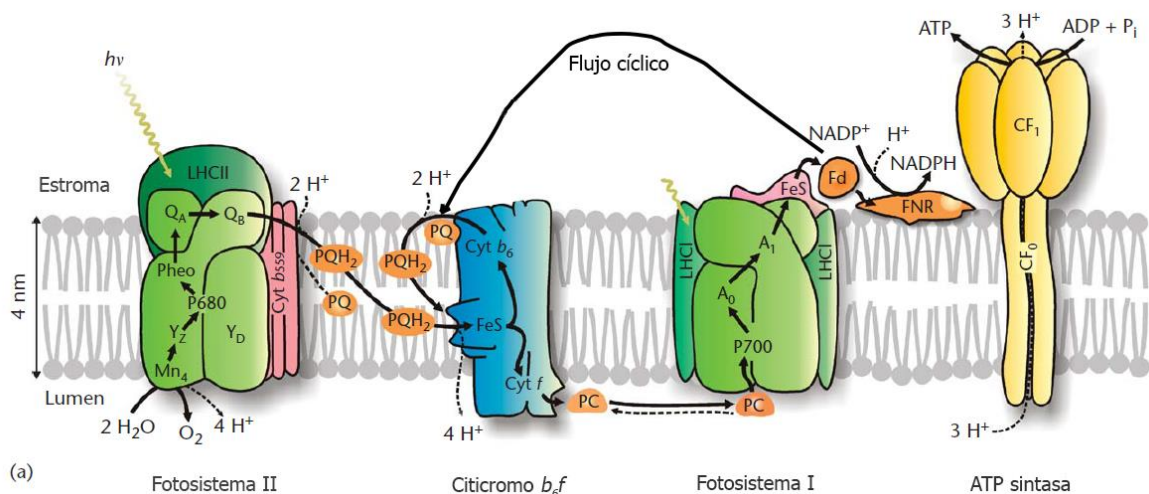


Figura 4 Representación esquemática del flujo electrónico inducido por la luz en los cloroplastos. El flujo electrónico puede ser lineal desde la excitación del LHCII hasta la formación de NADPH u ocurrir de forma cíclica donde la ferredoxina (Fd) producida dona electrones a la plastoquinona (PQ) que genera un gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa. LHC = Complejo recolector de luz, Y_Z, Y_{DD} = residuos de tirosina, P680 = Donador primario de electrones en el PSII, Pheo = Feofitina, Q_A = Primera quinona aceptora, Q_B = Segunda quinona aceptora, PQH₂ = Plastoquinol, FeS = Proteína ferrosulfurada de Rieske, Cyt = Citocromo, Pc = Plastocianina, P700 = Donador primario de electrones en el PSI, A₀ = clorofila a, A₁ = filoquinona, Fd = Ferredoxina, FNR = Fd:NADP⁺ reductasa, CF₀ = canal transmembranal, CF₁ = porción catalítica hidrofílica .

Imagen modificada de (Govindjee et al. 2010).

El plastoquinol formado a partir de las reacciones del PSII se separa de la proteína D1 del complejo y difunde a la bicapa lipídica uniéndose con un gran complejo de proteínas llamado citocromo b₆f. Cada molécula de PQH₂ dona los dos electrones anteriormente ganados, libera H⁺ hacia el lumen del tilacoide, regenerándose así la molécula PQ original. Los electrones ganados por el citocromo b₆f son transferidos hacia una molécula de plastocianina que donará electrones para regenerar el P700 del PSI (Karp, 2011).

El fotosistema I (PSI) es un complejo proteína-clorofila de membrana del cual aproximadamente un tercio de su masa total consiste en cofactores tales como clorofilas, carotenoides, filoquinonas y bloques de Fe₄S₄ (Nelson & Junge, 2015). Está formado por hasta 15 subunidades proteicas que tienen unidas de 4 a 6 subunidades que componen la antena periférica LHCI. El supercomplejo PSI-LHCI está conformado por aproximadamente 150 clorofilas a, 10 clorofilas b, 30 carotenos, 10 lípidos y 3 cúmulos de Fe₄S₄ (Jensen et al. 2007; Mazor et al. 2017). El LHCI transfiere energía luminosa al centro de reacción (RC) donde se localiza un heterodímero de clorofilas denominado P700. Al igual que el P680 del PSII, el P700 se excita y transfiere un electrón (quedando como P700*+) al aceptor primario de electrones A₀, un monómero de clorofila a. Luego el electrón se transfiere a A₁, una

filoquinona, y luego a 3 cúmulos interpolipeptídicos de Fe₄S₄, Fx, F_A y F_B, para transmitirlo a una ferredoxina, Fd, en el lado del estroma del tilacoide. Para la síntesis de NADPH —necesario en el ciclo de las reacciones del carbono—, la NADP⁺ reductasa requiere que dos ferredoxinas transfieren 2e⁻ a una molécula de NADP⁺ y que reaccione con un H⁺ del estroma. La plastocianina generada por las reacciones en cadena del PSII y del citocromo b₆f dona electrones al P700⁺ del PSI para regenerarlo (Figura 4) (Nelson & Yocum, 2006).

El flujo constante de electrones se da mediante el Complejo Emisor de Oxígeno (OEC- Oxygen-evolving complex), dentro del PSII, donde un complejo de manganos (Mn₄O₅Ca) promueve la ruptura de moléculas de agua para regenerar los electrones perdidos en el P680. Por cada dos moléculas H₂O se movilizan en el OEC 4e⁻, 4 H⁺ y una molécula de O₂ (Figura 5) (Colwell, 2008; Cox et al. 2015)

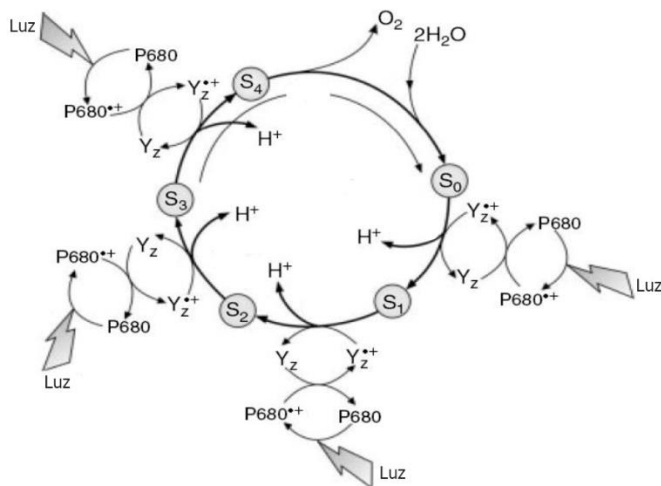
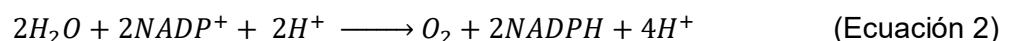


Figura 5 Movimiento electrónico mediado por el complejo de manganos Mn₄O₅Ca.

El proceso mediante el cual se movilizan electrones del agua para generar O₂ y 4H⁺ es conocido como ciclo de Kok y consta de 5 etapas que transcurren en el orden de μs. La clorofila P680⁺ se regenera a P680 al aceptar un electrón de un residuo de tirosina (D1-Tyr-161) de la proteína D1. La tirosina oxidada (Y⁺z) toma un electrón de un complejo de manganos (Mn₄O₅Ca) dentro del Complejo Emisor de Oxígeno (OEC- Oxygen-evolving complex) P680 = clorofila a, P680⁺ = clorofila a oxidada, Yz = D1-Tyr-161, Y⁺z = D1-Tyr-161 oxidada, S₀ a S₄ = Etapas del ciclo. Imagen modificada de (Colwell, 2008)

Hasta ahora se ha descrito el flujo electrónico lineal que transcurre desde el PSII hasta el PSI y que puede ser resumido en la Ecuación 2. Los 2H⁺ del lado de los reactivos provienen del lado del estroma del cloroplasto, mientras que los 4H⁺ generados como productos son liberados al lumen del cloroplasto donde, junto con los protones bombeados por la cadena transportadora de electrones fotosintéticos, son aprovechados para la síntesis de ATP por la ATP sintasa (Figura 4) (Blankenship, 2002)



Cuando el flujo de electrones es cíclico, es posible obtener un mayor gradiente electroquímico de protones (H^+) en una serie de reacciones en las que participa el PSI, como se ejemplifica en la Figura 4.

La absorción de los fotones y la excitación de las clorofilas se lleva a cabo en femtosegundos, mientras que la separación estable de las cargas ocurre en la escala de los nanosegundos (Nelson & Junge, 2015). Cuando la luz es muy intensa, los LHCs pueden deshacerse de la energía absorbida en exceso mediante disipación no fotoquímica (NPQ) y así regular la transmisión de la energía de excitación a los centros de reacción; la excitación no balanceada de ambos fotosistemas (PSII y PSI) puede ser equilibrada mediante la movilización de agregados de LHCII, que preferentemente se encuentran asociados al PSII. Finalmente, estos complejos ayudan al mantenimiento de la estructura de la membrana del tilacoide (Schmid, 2008).

3.2 FASE DE LAS REACCIONES DEL CARBONO

El NADPH y el ATP sintetizado durante las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis son reactivos necesarios para la síntesis de carbohidratos —mediante la fijación de CO_2 ambiental— en la Fase de las reacciones del carbono, antiguamente llamada Fase oscura de la fotosíntesis porque en experimentos realizados con preparaciones de cloroplastos aislados se encontró que podía fijarse CO_2 siempre y cuando se suministraran glucosa-1-fosfato y los productos de las reacciones de la fase luminosa (ATP y NADPH) (Trebst et al. 1958); actualmente se considera incorrecto emplear en término, ya que existe evidencia de que la luz es fundamental para la modulación de la actividad de varias de las enzimas que participan en la Fase de las reacciones del carbono (Buchanan, 2016).

La fase de las reacciones del carbono recibe el nombre de Ciclo de Calvin o ciclo de Benson–Bassham-Calvin (BBC) haciendo mención a los principales investigadores que lo describieron. El primer paso del ciclo es la fijación de CO_2 en la ribulosa 1,5-bisfosfato, (RuBP) —un azúcar fosfato de cinco carbonos— mediada por la enzima Rubisco (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa). El azúcar de 6 carbonos es dividido en dos y se generan dos moléculas de 3 carbonos. Existe una serie de pasos subsecuentes que culminan con la regeneración de la RuBP (Hassham et al. 1954).

En la Figura 6 se representa el ciclo de BBC. Dentro de los círculos hay números que hacen referencia a la Tabla 1 donde se enlistan las enzimas involucrados en cada reacción

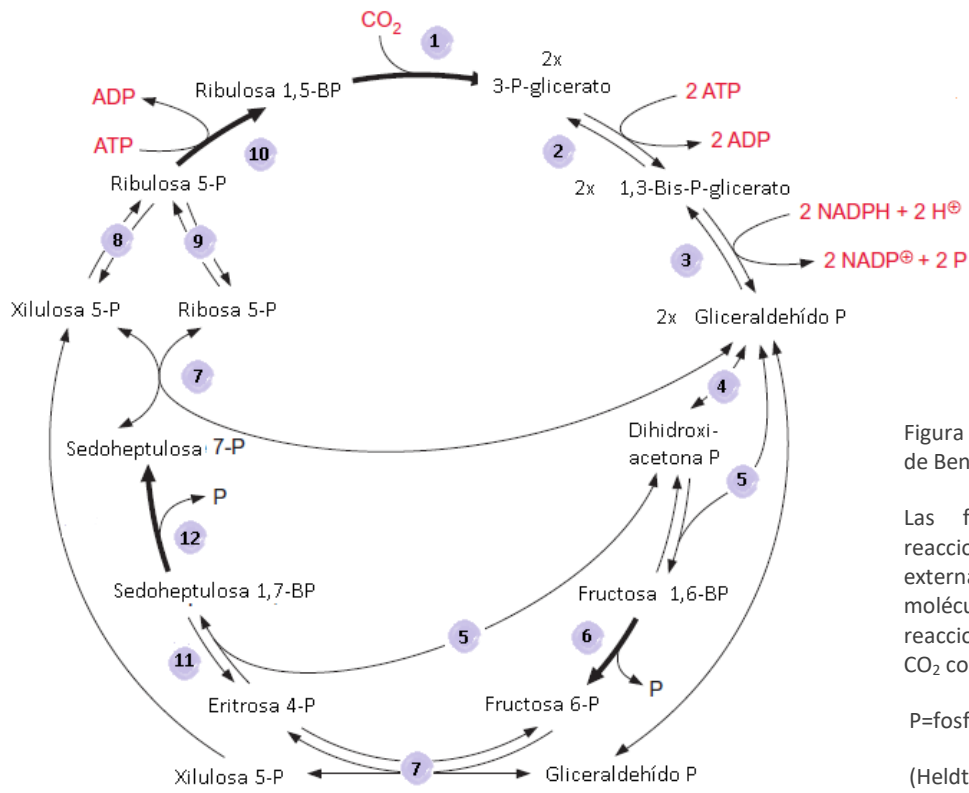


Figura 6. Representación del ciclo de Benson-Bassham-Calvin.

Las flechas oscuras denotan reacciones irreversibles. En la parte externa del ciclo se denotan las moléculas que provienen de las reacciones de la fase luminosa y el CO₂ con el que comienza el ciclo.

P=fosfato, BP= Bisfosfato

(Heldt & Piechulla, 2011)

Tabla 1. Relación de enzimas que participan en el ciclo de Benson-Bassham-Calvin y su número EC. Los números en círculos de la Figura 6 indican la enzima que participa en la reacción que señalan.

#	Enzima	# EC
1.	Rubisco	4.1.1.39
2.	Fosfoglicerato cinasa	2.7.2.3
3.	NADP-Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa	1.2.1.13
4.	Triosa fosfato isomerasa	5.3.1.1
5.	Aldolasa	4.1.2.13
6.	Fructosa 1,6-bisfosfatasa	3.1.3.11
7.	Transcetolasa	2.2.1.1
8.	Ribulosa fosfato epimerasa	5.3.1.16
9.	Ribosa fosfato isomerasa	5.1.3.4
10.	Ribulosa fosfato cinasa	2.7.1.19
11.	Transaldolasa	2.2.1.2
12.	Sedoheptulosa 1,7-Bisfosfatasa	3.1.3.37

El ciclo de Benson–Bassham-Calvin consta de tres etapas:

1. La **carboxilación** de una molécula de azúcar de cinco carbonos, la ribulosa 1,5-bisfosfato o RuBP, para dar lugar a la formación de dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

2. La **reducción** del 3-fosfoglicerato (3-PGA) a gliceraldehído-3-fosfato (G3P) con ATP y NADPH.
3. La **regeneración** del aceptor de CO₂, la RuBP, mediante una serie de reacciones en cadena.

Para la regeneración de 3 moléculas de la RuBP se necesitan 5 G3P, para lo cual es necesaria la asimilación de 3 moléculas de CO₂ que producen 6 G3P. La molécula de G3P que no se requiere para la regeneración puede emplearse para la síntesis de glucosa (Figura 7) y almidones.

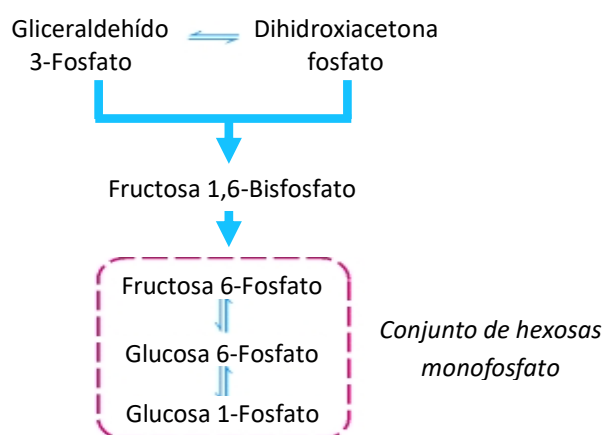


Figura 7 Formación de hexosas fosfato empleando como precursor el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) procedente del ciclo de Benson-Bassham-Calvin. (Berg et al. 2002)

3.3 METABOLISMO C₃, C₄ Y CAM

En todas las plantas se lleva a cabo el ciclo de BBC sin embargo, no en todas comienza desde el momento en que el CO₂ entra al cloroplasto; algunas plantas lo fijan primeramente en otras moléculas para formar un compuesto estable, y luego de una serie de reacciones lo liberan para dar inicio al ciclo.

En las plantas con metabolismo C₃ el primer compuesto estable formado es una molécula de 3 carbonos, el 3-fosfoglicerato (Figura 6). Las plantas C₃ carecen de un mecanismo concentrador de dióxido de carbono, por lo que la Rubisco puede carboxilar (fotosíntesis) u oxigenar (fotorespiración) al azúcar RuBP en los mismos sitios activos.

En las plantas con metabolismo C₄ el CO₂ ambiental se incorpora sobre fosfoenolpiruvato (PEP), al interior de las células del mesófilo (M) formándose oxaloacetato (OAA). El OAA se convierte a malato o a aspartato y se transfiere a una célula del haz vascular (HV) donde

luego de varias reacciones se descarboxilará. El CO_2 liberado al interior de las células del haz vascular es empleado en el ciclo de BBC.

Se han identificado 3 subtipos de metabolismo C_4 por las que el CO_2 atmosférico puede llegar hasta las células del haz vascular (Ludwig, 2016):

- 1) Plantas C_4 NADP-ME: El OAA es reducido en el cloroplasto de las células M a malato mediante la enzima NADP-malato deshidrogenasa. El malato es transportado a las células HV donde es descarboxilado en el cloroplasto.
- 2) Plantas C_4 NAD-ME: El OAA es transformado a aspartato (Asp) en el citosol de las células M, por transaminación. El Asp formado es transferido a la mitocondria de las células HV donde es convertido de nuevo a OAA y luego a malato para descarboxilarlo mediante la enzima NAD-ME.
- 3) Plantas C_4 PEP-CK: En este tipo de plantas se forma tanto malato como aspartato. En las células M, el OAA es transformado a Asp (citosol) y a malato (cloroplasto). El Asp se transfiere a las células HV donde es descarboxilado en el citosol mediante la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas (PEP-CK). El malato es transferido a la mitocondria de las células HV donde se descarboxila por la enzima NAD-ME.

Las plantas con metabolismo C_4 son más eficientes que las C_3 en cuanto a la fijación de carbono ya que en las células del haz de la vaina el CO_2 puede alcanzar concentraciones entre 2.5 y 8 veces mayores que la ambiental (Dai et al. 1993; He & Edwards, 1996; Kiirats et al. 2002)

Existe otro grupo de plantas que presenta el llamado “metabolismo ácido de las crasuláceas”, o CAM por sus siglas en inglés, el cual les permite vivir en ambientes con poca agua y altas temperaturas. Las plantas CAM permiten la entrada de CO_2 a las células durante la noche, lo fijan a moléculas de fosfoenolpiruvato y producen oxaloacetato —un ácido C_4 — que al reducirse produce ácido málico que se almacena en las vacuolas. Durante el día, con los estomas cerrados, no hay incorporación de CO_2 y el ácido málico almacenado en las vacuolas es trasladado a los cloroplastos donde, por descarboxilación, libera el CO_2 fijado durante la noche para dar inicio al ciclo de Benson-Bassham-Calvin. Las plantas CAM,

al igual que las C₄, minimizan la competencia del oxígeno por los sitios activos de la Rubisco (Sujatha, 2015).

3.4 RUBISCO

La reacción que cataliza la Rubisco llega a ser, en determinadas condiciones, la limitante del ciclo de BBC debido a su baja tasa catalítica (Formighieri, 2015; McNevin et al. 2006), a que aunque presenta 100 veces más selectividad hacia la fijación de CO₂ que de O₂ —alrededor de una molécula de O₂ es fijada por Rubisco por cada 3 de CO₂ ya que la concentración ambiental de los gases es de 0.04% para CO₂ y de 21% para O₂ (Sharkey, 2001) — y a la necesidad de ser activada por la chaperona molecular Rubisco activasa (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa activasa), quien retira los inhibidores que bloquean sus sitios activos (Portis, 1995). Las limitaciones que tiene la Rubisco en cuanto a eficiencia y selectividad las subsana con su abundancia en los tejidos verdes. Carmo-Silva y otros (2015) presentan una tabla comparativa entre especies donde muestran que en algunos pastos C₄, la Rubisco representa alrededor del 25% respecto al contenido total de proteína, mientras que en la cebada (especie C₃) llega a representar hasta el 74%.

Se espera que con el aumento de la concentración de CO₂ ambiental en los próximos años, la incidencia de la fotorespiración disminuya (Walker et al. 2016). Durante la fotorrespiración se produce una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de fosfoglicolato. El fosfoglicolato es transformado a glicolato y exportado al peroxisoma donde se transforma en glicina y es transferido a la mitocondria donde por descarboxilación oxidativa y una serie de reacciones es transformada en serina y exportada al peroxisoma donde se transforma en glicerato y pasa al cloroplasto. En el cloroplasto, el glicerato se convierte en fosfoglicerato, mediante el gasto de una molécula de ATP, e ingresa al ciclo de BBC. La fotorespiración es energéticamente costosa —cada oxigenación que cataliza la Rubisco consume 3.5 ATP y 2 NADH— y se estima que disminuye el rendimiento de los cultivos de soya y trigo en 36% y en 20%, respectivamente (Walker et al. 2016), sin embargo, es importante en el metabolismo de las plantas ya que promueve la remoción de intermediarios metabólicos tóxicos, protege de la fotoinhibición, apoya las reacciones de defensa y está íntimamente ligada con las reacciones del metabolismo primario (Peterhansel et al. 2010).

La Rubisco se encuentra presente en plantas, bacterias quimiotróficas, cianobacterias, algas rojas y cafés formando hexadecámeros constituidos por 8 subunidades grandes (L, 50 a 55 kDa) y 8 pequeñas (S, 12 a 18 kDa) que juntas forman una estructura L8S8 (Figura 1. Cada hexadecámero tiene 8 sitios activos localizados únicamente en el espacio interdímico entre el dominio carboxilo terminal de una isoforma grande y el amino terminal de otra. La estructura formada permite que los sitios activos queden expuestos hacia la cara externa del hexadecámero (Knight et al. 1990).

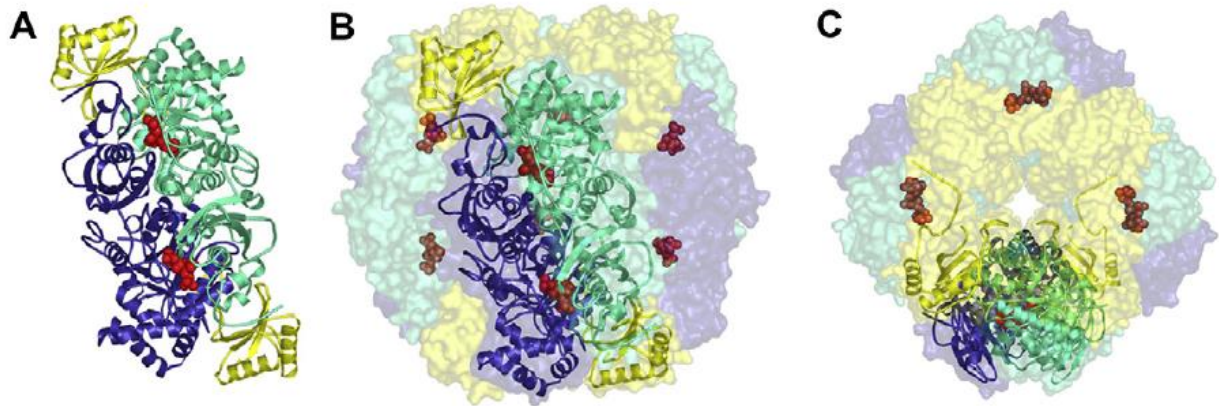


Figura 8. Diferentes vistas de la estructura cuaternaria de Rubisco.

A) Tetrámero L2S2. Vista en la que se aprecia su simetría rotacional de orden 2. B) Hexadecámero L8S8 con la misma simetría rotacional de orden 2. C) Vista del hexadecámero con simetría de orden 4. Las subunidades pequeñas se representan con color amarillo, las grandes se representan con color azul y verde. Entre ellas, en rojo, una molécula similar a su sustrato, la 2-CABP. Imagen tomada de Anderson y Backlund (2008)

Para que la Rubisco pueda carboxilar u oxigenar a su sustrato, la RuBP, debe antes activarse. Para tal fin, lo primero que ocurre es la carbamilación de la lisina 201 (residuo ampliamente conservado entre las plantas) y la estabilización de las cargas con un ion Mg^{2+} . Luego de eso, la RuBP puede ser empleada como sustrato y convertirse en un 2,3-enediol que puede recibir CO_2 u O_2 (Spreitzer & Salvucci, 2002).

3.5 RUBISCO ACTIVASA

Bajo ciertas condiciones la Rubisco puede unir fuertemente azúcares fosfato que inhiben su actividad (Wachter & Henderson, 2015). La Rubisco activasa remueve los inhibidores del sitio activo de Rubisco, facilitando su acción carboxilasa/oxigenasa (Figura 9) (Wang & Portis, 1992).

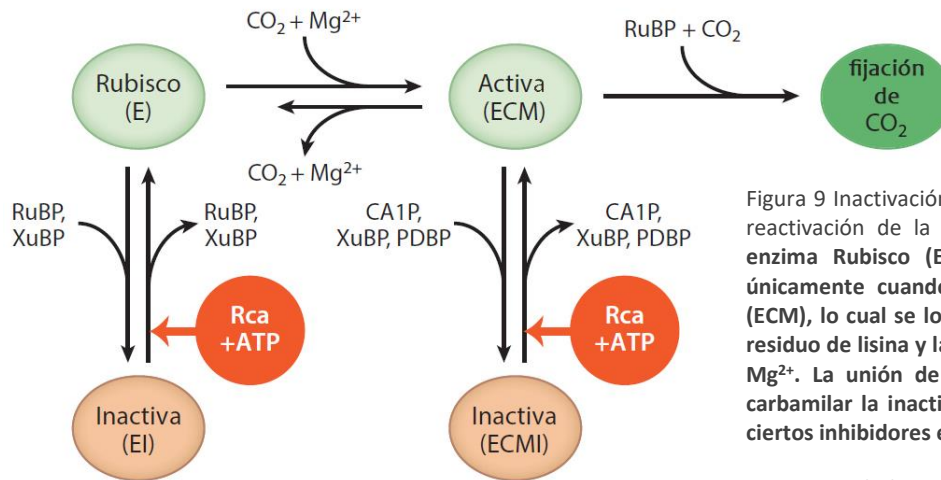


Figura 9 Inactivación de la Rubisco por azúcares fosfato y reactivación de la Rubisco por la Rubisco activasa. La enzima Rubisco (E) lleva a cabo la fijación de CO_2 únicamente cuando se encuentra en su forma activa (ECM), lo cual se logra mediante la carbamilación de un residuo de lisina y la estabilización de la carga por un ion Mg^{2+} . La unión de azúcares fosfato en la Rubisco sin carbamilar la inactiva (EI), al igual que cuando se unen ciertos inhibidores en la ECM (ECMI).

RuBP = Ribulosa-1,5-bisfosfato, XuBP = Xilulosa-1,5-bisfosfato, PDBP = Pentadiulosa-1,5-bisfosfato, CA1P = 2-carboxi-D-arabinitol 1-fosfato, Rca = Rubisco activasa
 Imagen modificada de (Bracher, 2017)

La Rubisco activasa (Rca) es una proteína con función de chaperona molecular (Sánchez de Jiménez, 1995) y actividad de ATPasa sensible a inhibición por ADP (Robinson y Portis, 1989) que pertenece a la familia de las ATPasas asociadas con diversas actividades celulares (familia AAA+) (Neuwald et al. 1999). Las proteínas AAA+ se encuentran en todos los reinos de los seres vivos y participan en diversos procesos celulares, tales como la fusión de membrana, la replicación del DNA y la proteólisis. Una característica importante de estas proteínas es que contienen una o más copias del motivo AAA+ y frecuentemente forman estructuras anulares oligoméricas (6 a 7-mer). La estructura anular de las proteínas AAA+ perturba estructuras moleculares o macromoleculares mediante el desdoblamiento de proteínas, el desacoplamiento de complejos proteicos, el desenrollado del DNA, o la inducción de alteraciones en complejos DNA-proteína (Ogura & Wilkinson, 2001).

La Rubisco activasa en eucariontes es una proteína codificada en el núcleo que contiene un péptido señal que le permite la entrada al cloroplasto, lugar en donde lleva a cabo su acción (Werneke et al. 1988). Usualmente se encuentran dos isoformas de Rca en plantas: una grande de 45 a 48 kDa (α , RcaL L= large) y una pequeña (β , RcaS S= small) de 41 a 34 kDa. Las isoformas de la Rca pueden provenir de genes diferentes cada una (en algodón y camote) (Salvucci y otros, 2003; Jiang et al. 2013), de un mismo gen (en trigo, arroz, A.

thaliana y espinaca) (Law y Crafts-Brandner, 2001; Werneke et al. 1989) o de genes diferentes y además presentar splicing¹ alternativo (en cebada, maíz y soya) (Rundle & Zielinski, 1991; Yin et al. 2010; Yin et al. 2014), o como en el caso de plantas de tabaco presentar más de tres genes pero solo la isoforma β (Quian & Rodermeil, 1993).

La Rubisco activasa es una proteína que se encuentra en todas las plantas verdes, así como en otros organismos fotosintéticos, y está ampliamente conservada entre especies. Con base en la estructura cristalográfica de *Nicotiana tabacum*, Stotz et al. (2011) sugieren que la Rca funciona como un hexámero con un poro central donde tiene expuestas asas con los residuos requeridos para remodelar a la Rubisco usando ATP con el fin de liberarla de los azúcares inhibitorios.

Se ha estudiado a la Rca desde hace ya varios años y se ha relacionado con una alta tasa de asimilación de CO₂, con plantas que producen altos rendimientos de productividad en granos (Yin et al. 2014), así como con un fenotipo robusto (Morales et al. 1999), un mayor crecimiento de la planta (Almeraya, 2005) y un mayor actividad de la Rubisco (Martínez-Barajas et al. 1997). Se han realizado trabajos de escrutinio y de sobreexpresión de la Rca con la finalidad de obtener plantas con mayor capacidad fotosintética y ello ha contribuido a comprender cómo colabora cada isoforma. La Rca α se ha asociado con plantas con mayor tasa fotosintética, menor tiempo de floración, mayor altura, mayor productividad en grano (Wu et al. 2006; Wang et al. 2010), mayor tolerancia ante estrés térmico (Crafts-Brandner et al. 1997) donde en algunas ocasiones se expresa selectivamente (Law et al. 2001; Ristic et al. 2009). Por otro lado, la isoforma β contribuye más activamente a aumentar la velocidad que alcanza la fotosíntesis en el estado estacionario tras un incremento en la intensidad luminosa (Yamori et al. 2012) y, en plantas de arroz, a conferir tolerancia ante el estrés térmico (Wang et al. 2010). Se ha visto que en condiciones de estrés hídrico la expresión de la Rubisco activasa y sus mRNAs pueden aumentar (Pelloux et al. 2001), así como también pueden encontrarse nuevos mRNAs producto de splicing alternativo (Salekdeh et al. 2002)

¹ El término *splicing* proviene del inglés y ha sido adoptado por la comunidad científica al lenguaje español. Dicha palabra hace mención al proceso de corte y empalme que se da durante la maduración del mRNA

3.6 REGULACIÓN DE LA RUBISCO ACTIVASA Y DEL CICLO DE BBC

Los genes de la Rubisco activasa presentan, rio arriba del sitio de inicio de la transcripción, varios elementos de respuesta a estrés: 3 que responden a estrés hídrico y 2 a estrés por calor (Chen et al. 2015). Aunque las distintas isoformas de la Rubisco activasa pueden provenir de un mismo gen, cada una tiene distintos mecanismos de regulación. Experimentos previos con *Arabidopsis* (Zhang y Portis, 1999; Zhang et al. 2001; Wang & Portis, 2006) ha permitido entender que la isoforma α , en su C-terminal, contiene 2 residuos de cisteína regulados por la tiorredoxina-f y que cuando dichos residuos se oxidan y forman puentes disulfuro, la afinidad por ATP decrece y se torna más sensible a la inhibición por ADP, en contraste con la isoforma β , que no se regula por dicho mecanismo (Carmo-Silva y Salvucci, 2013) pero que al combinarse con la isoforma α , formando un hetero-oligómero, es sensible a la regulación redox (Zhang et al. 2001).

Como ya se describió en páginas anteriores, la Rubisco activasa es fundamental para la activación de la Rubisco, pero no es el único factor a considerar cuando se habla de fotosíntesis. Existen varios factores que influyen en la tasa fotosintética, entre ellos puede citarse la conductancia del mesófilo (g_m) (Niinemets et al. 2009), la conductancia desde el espacio intercelular hasta el estroma del cloroplasto (g_i) (Yamori et al. 2006), la conductancia estomática (g_s) (Fischer et al. 1998), la tasa de regeneración del azúcar RuBP (Lefebvre et al. 2005), la tasa de transporte de electrones (ETR) y la tasa de carboxilación de la Rubisco (Yamori et al. 2008).

El ciclo de BBC está conformado por una serie de reacciones coordinadas entre sí, que además deben acoplarse con el resto de las reacciones del metabolismo de las plantas para evitar un gasto energético innecesario. Las plantas reaccionan de formas diversas cuando se ven sometidas a cambios en su entorno, ya sea por la presencia de fitohormonas, por la cantidad de nutrientes disponibles, por agentes que provoquen estrés abiótico o biótico, por modificaciones en la intensidad luminosa o por la transición del día a la noche que ocurre de forma rítmica. Existe una gran variedad de genes en el metabolismo de las plantas cuya regulación transcripcional tiene ritmo circadiano, y entre ellos se encuentran varios de los que intervienen en la fotosíntesis (Harmer et al. 2000; Noordally et al. 2013)

A nivel enzimático, la regulación del ciclo de BBC se da por varios mecanismos (Figura 10).

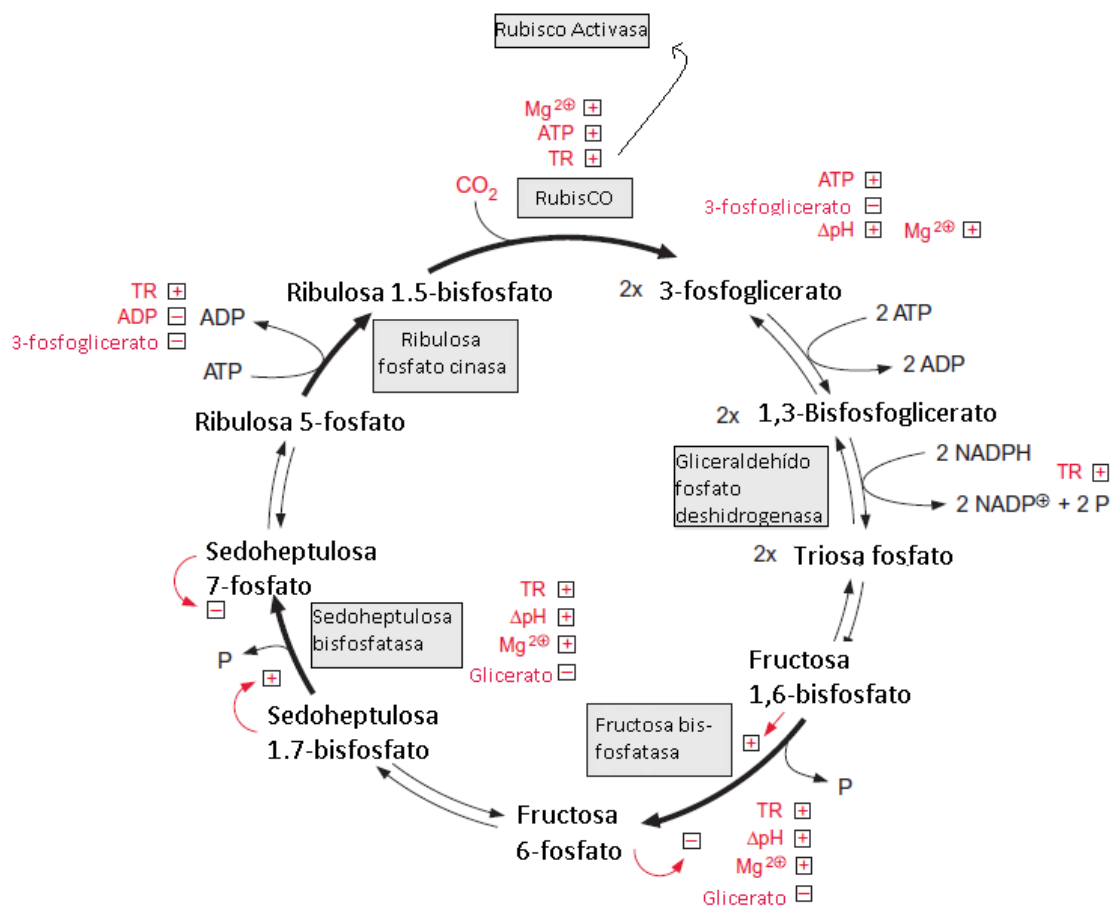


Figura 10. Regulación del ciclo de Benson-Bassham-Calvin.

Esta figura muestra de forma resumida lo que se comentó en la sección anterior. [+] significa que incrementa la actividad; mientras que [-], que disminuye. Se presenta también la regulación de Rubisco activasa (aunque no forma parte de las enzimas del ciclo) porque su presencia y actividad es fundamental para la actividad de Rubisco. La imagen fue modificada de Heldt & Piechulla (2011)

El primer mecanismo de regulación está a cargo de las tioredoxinas (TRXs), proteínas óxido-reductasas con un motivo ditiol-disulfuro en su sitio activo, cuyo puente disulfuro de su sitio activo se reduce en presencia de luz con lo que pueden luego reducir y activar a otras proteínas o promover la ruptura del enlace disulfuro de una proteína. Las TRXs son regeneradas por tioredoxin reductasas (TRs). La reducción de las TRXs dependiente de las TRs es llamada sistema TRX. Las plantas tienen dos tipos de sistemas TRX: aquellos en los que las TRs dependen de ferredoxinas y aquellos que dependen de NADPH. Existen varios tipos de TRXs en cloroplastos: los h, o, f, m, x, y, z, que intervienen en diferentes etapas de la regulación (Nikkanen & Rintamäki, 2014). Las proteínas del ciclo de Benson-Bassham-Calvin reguladas por esta vía son: la ribulosa fosfato cinasa (EC. 2.7.1.19), la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa (EC. 3.1.3.37), la NADP-gliceraldehído fosfato

deshidrogenasa (EC. 1.2.1.13), la forma cloroplástica de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (EC. 3.1.3.11) y la Rubisco activasa (EC. 4.1.1.36). La Rubisco activasa, a pesar de no haber sido descrita como un componente del ciclo de BBC, es una proteína que necesita estar presente para que Rubisco pueda llevar a cabo sus funciones de carboxilasa y de oxigenasa (Heldt & Piechulla, 2011)

Otro mecanismo de regulación dependiente de la luz se basa en el cambio de la actividad de las proteínas como respuesta a la concentración de Mg^{2+} y del pH en el estroma de los cloroplastos. En el primer caso, se ha visto que el magnesio puede favorecer la actividad de 3 enzimas del ciclo (Heldt & Piechulla, 2011) y de la Rubisco activasa. Ishijima y otros (2003) señalan que la concentración de Mg^{2+} libre en el estroma de plantas de espinaca cambia de 0.5 mM a 2 mM en la transición oscuridad-luz. Por su parte, Hazra y otros (2015) cuantificaron, mediante ensayos *in vitro* con componentes de tabaco, el incremento de la actividad catalítica (kcat/km (aparente) de la Rubisco activasa debida al incremento de Mg^{2+} libre: 5 veces si aumenta de 0.1 mM a 2 mM y hasta 9 veces en concentraciones de 8.5 mM. El pH varía con la luz: la alcalinización del estroma en la transición luz/oscuridad —pH 7.2 hasta pH 8.0— favorece la actividad de las enzimas fotosintéticas (Heldt & Piechulla, 2011). El tercer mecanismo de regulación es efectuado por el producto de reacción de las enzimas fructosa-1,6-bisfosfatasa (inhibida por la fructosa-6-fosfato) y la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (inhibida por la sedoheptulosa-7-fosfato)

La actividad de la Rubisco responde a varias señales entre las que se puede citar la intensidad de luz, el balance entre la obtención y almacenamiento de carbohidratos, la temperatura, la hora del día, inhibidores, cantidad y estabilidad de Rubisco activasa (Parry et al. 2008)

3.7 LA CEBADA EN MÉXICO Y EL MUNDO

El estudio del ciclo de BBC y la regulación de Rubisco por la Rubisco activasa es de suma importancia debido a que la alimentación del hombre (FAO, 1998 y 2003) y del ganado (IAASTD, 2009) depende en gran medida del consumo de plantas —que son organismos fotosintéticos. La FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura) ha establecido que el grupo de los cereales está compuesto por 17 productos

(FAO, 1994), de todos ellos los 5 que más se producen en México y el mundo son maíz, arroz, trigo, cebada y sorgo (Figura 11).

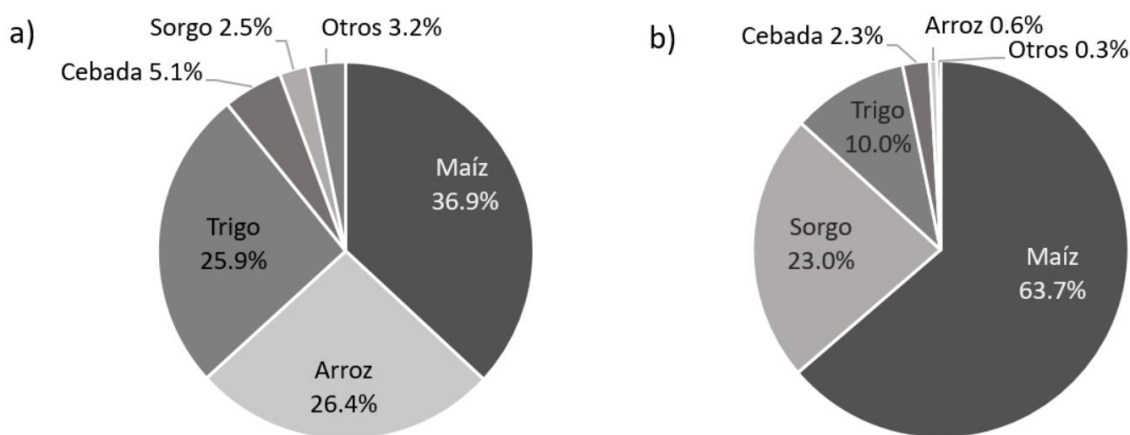


Figura 11 Producción porcentual de cereales a nivel mundial (a) y en México (b) durante el año 2014. En el rubro de Otros se incluyen los cereales mijo, avena, triticale, centeno, fonio, quinoa, alpiste y una variedad de amarantos. (FAO, 2014)

La cebada se encuentra dentro de los cinco cereales que más se cosechan en México y en el mundo, ocupando el cuarto lugar en producción en ambos casos. Los 5 mayores productores de cebada en el mundo son Rusia, Francia, Alemania, Australia y Ucrania (Figura 12), México ocupa el lugar 33 en producción de cebada en el mundo (FAO, 2014), contribuyendo al 5.3% de la producción mundial de cebada (SIAP, 2014).

Del total de la producción de cebada en México, menos del 30% proviene de variedades destinadas a la alimentación del ganado (FIRO, 2013), mientras que el resto proviene de variedades empleadas para la producción de malta² cervecera. La producción de cebada aumentó 67.2% al año 2016, con respecto a 2013, y se espera que continúe en aumento para disminuir la importación del grano. La cerveza es el principal producto agroalimentario de exportación y México ocupa el primer lugar internacional en exportación (SAGARPA, 2017). En México la producción de cebada se concentra en 6 estados que producen el 96% de la producción nacional (Figura 13, a) siendo el estado de Guanajuato el que produce la mayor cantidad. El 40% de la producción nacional de cebada, en 2014, se obtuvo bajo

² El proceso de malteado se puede definir como la germinación del grano bajo condiciones controladas seguido por un secado lento y cuidadoso para preservar la máxima actividad enzimática posible. La malta se emplea para convertir el almidón de granos en azúcares sencillos que puede asimilar *Saccharomyces spp.* y transformar en alcohol (Serna, 2001).

condiciones de riego; mientras que el 60% restante, bajo condiciones de temporal (Figura 13, b).

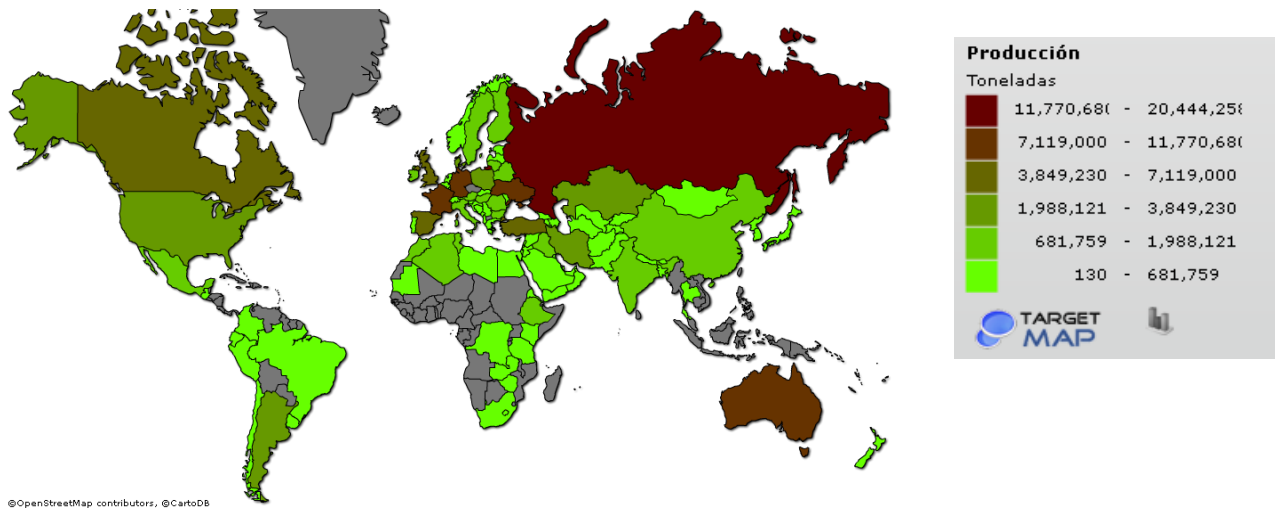


Figura 12 Producción mundial de cebada medida en toneladas. México produjo 845,707 toneladas en 2014, ocupando el lugar 33 a nivel mundial. No se cuenta con datos de producción de los países sombreados en gris. (FAO, 2014).

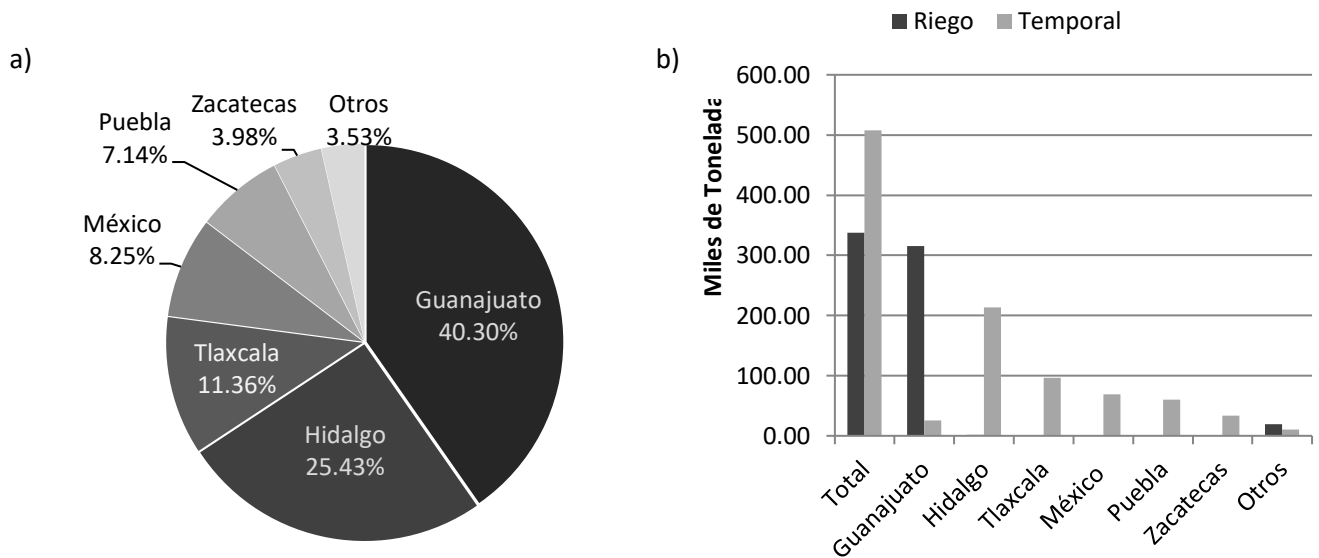


Figura 13 . Producción de cebada en México. Principales estados productores de cebada en México (a) y producción de cebada bajo condiciones de riego y de temporal en el año 2014 (SIAP, 2014).

La cebada es una planta que pertenece al género *Hordeum* en la tribu Triticeae dentro de la familia de las gramíneas. La cebada se domesticó a partir de *H. vulgare ssp. spontaneum* en el área del Medio Oriente hace 10,000 años. Este organismo fue uno de los primeros cereales domesticados por el hombre.

Existen 2 variedades de cebada que difieren en la cantidad de hileras de granos presentes en la espiga: *Hordeum hexastichum*, con 6 hileras y *Hordeum distichum*, con 2 hileras, ambas especies se pueden agrupar bajo el nombre de *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*. Las variedades comparten características morfológicas similares, particularmente la presencia de 3 espiguillas (Figura 14) en cada nudo del raquis, llamadas triplete, que pueden o no ser fértiles: en la cebada de 6 hileras todas las espiguillas son fértiles y dan lugar a grano, mientras que en la cebada de 2 hileras las espiguillas laterales son infértiles y no producen grano (Australian Government, 2008). Este cereal es una planta cleistógama que no suele fecundarse por polinización cruzada, (Hermannsson et al. 2010).

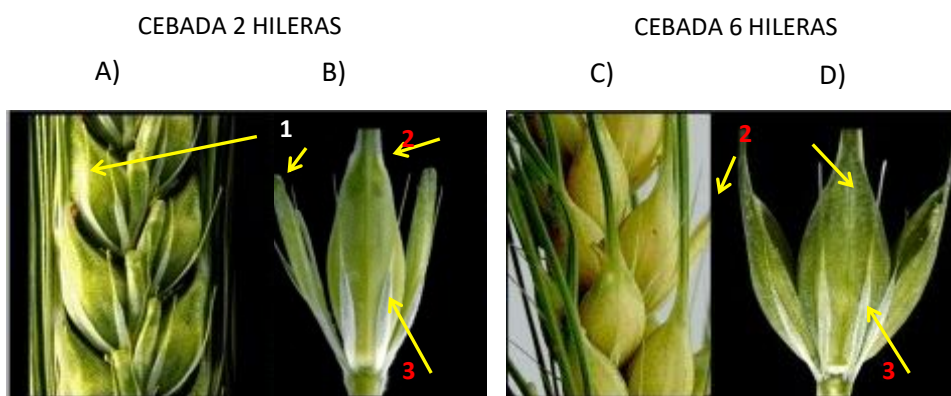


Figura 14. Espigas y espiguillas de cebada. La cebada de 2 hileras (A y B) es aquella que tiene un par de espiguillas infértiles (B,1) que resultan en espigas planas y una espiguilla fértil donde se desarrolla el grano (B,2). La cebada de 6 hileras (C y D) tiene todas sus espigas fértiles (D,2) lo que produce una espiga circular. Ambos tipos de espigas tienen glumas (3) (Waugh et al. 2013).

Para describir la etapa de desarrollo se han desarrollado códigos numéricos que hacen alusión a momentos específicos del desarrollo. Feekes (1941) desarrolló un código que fue ilustrado por Large (1954), posteriormente Zadoks et al. (1974) desarrollaron otro código decimal (ANEXO II) que posteriormente Tottman & Broad (1987) ilustraron y que se muestra parcialmente en la Figura 15. El código propuesto por Zadoks es el más empleado.

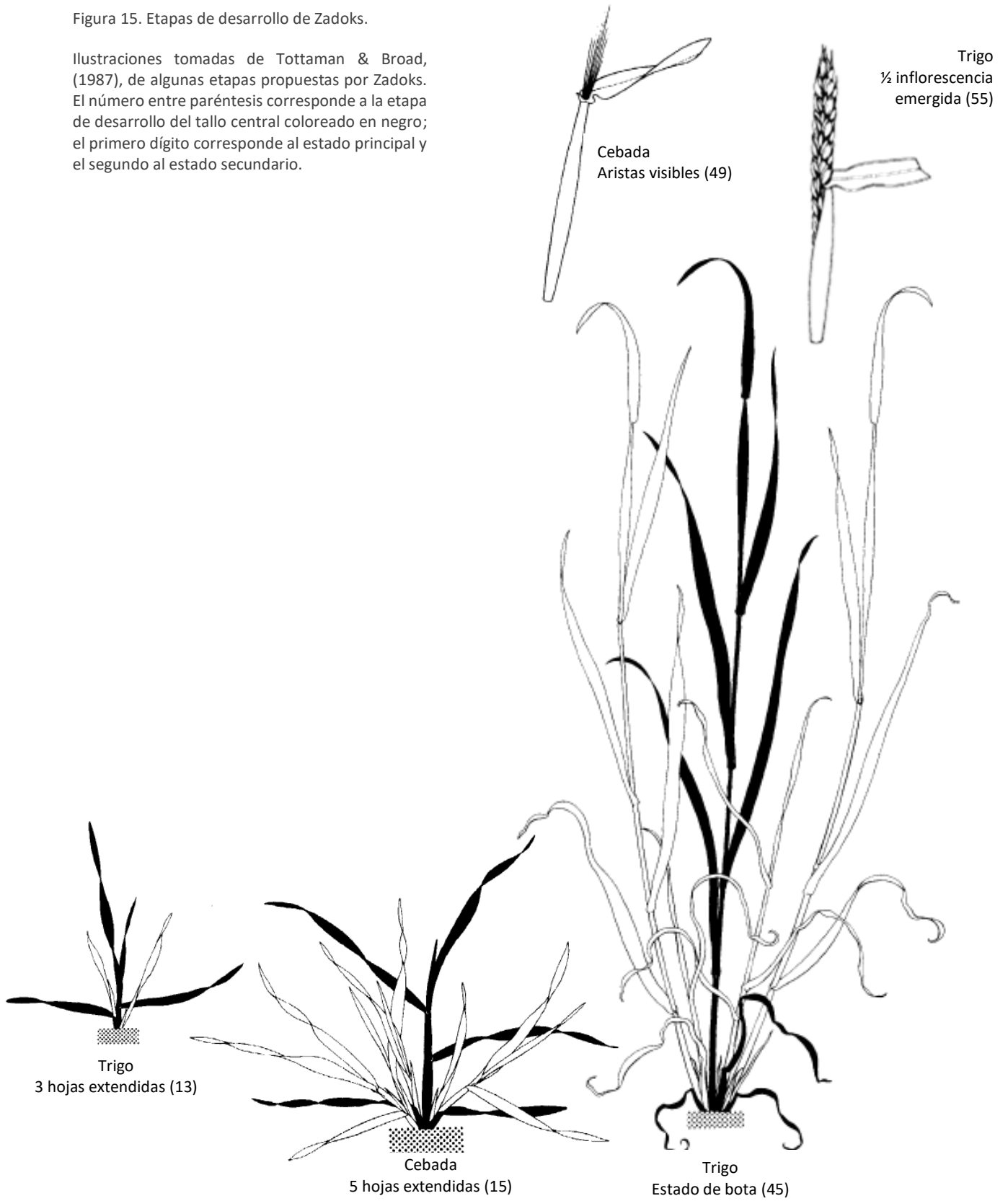
La cebada es una planta que ha sido de interés para los científicos de gran parte del mundo porque es una especie diploide que se autofecunda, con pocos cromosomas ($2n = 14$) que además son de gran tamaño, es fácil producir cruza, crece en una gran variedad de condiciones climáticas (Saisho & Takeda, 2011) y porque es un cereal con gran importancia económica. Algunos de los estudios realizados con esta planta están relacionados con

diversos tipos de estrés (e.g. hídrico (e.g. Samarah, 2005; Robredo et al. 2007; Habibi, 2012; Fayed & Bazaid, 2014), salino (Cramer & Nowak, 1992; Yongchao, 1998; El-Tayeb, 2005), térmico (Havaux & Tardy, 1999; Wahid & Shabbir, 2005; Rollins et al. 2013), así como aspectos nutricionales relacionados con la supervivencia y rendimiento de la planta (Chapin et al. 1988; Cantero-Martínez et al. 2003; Lopes et al. 2004), y también con aspectos relacionados con la fotosíntesis y el llenado de grano (Tambussi et al. 2007; Bingham et al. 2007; Kohl et al. 2015).

Una de las proteínas claves para la fotosíntesis es la Rubisco activasa (Rca) al ser la chaperona molecular de la Rubisco (ver sección 3.5). La Rca en cebada está codificada por dos genes, el gen *RcaA* genera una isoforma α de 46 kDa (RcaA1) y una β de 42 kDa (RcaA2) por splicing alternativo, el gen *RcaB* genera una isoforma de 42 kDa (RcaB) (Rundle & Zielinski, 1991a). La cantidad de los mRNAs y las proteínas de la Rca se distribuye a lo largo de las hojas de cebada diferencialmente: en la región más fotosintéticamente activa la abundancia relativa de los transcritos *RcaA2* es entre 20 y 100 veces más que *RcaA1* o *RcaB*, y ante incrementos de los mRNAs las proteínas de la Rca igualmente se incrementan mas no en la misma proporción (Rundle & Zielinsky, 1991b). Se sabe que en cebada la Rca es una de las proteínas que modifican su expresión en condiciones de estrés (Ozturk et al. 2002; Fatehi et al. 2012; Rollins, et al. 2013; Kausar et al. 2013).

Figura 15. Etapas de desarrollo de Zadoks.

Ilustraciones tomadas de Tottaman & Broad, (1987), de algunas etapas propuestas por Zadoks. El número entre paréntesis corresponde a la etapa de desarrollo del tallo central coloreado en negro; el primero dígito corresponde al estado principal y el segundo al estado secundario.



4 HIPÓTESIS

La expresión de las isoformas de la Rubisco activasa (RCA) varía a lo largo del desarrollo de la planta de cebada, conduciendo a cambios en la actividad de la Rubisco.

5 OBJETIVOS

- ❖ Determinar si existe variación en la cantidad total de la Rubisco activasa o de sus isoformas a lo largo del desarrollo de plantas de cebada de una variedad de 6 hileras.
- ❖ Determinar si los niveles de mRNA de las distintas isoformas de la Rubisco activasa reflejan la cantidad de proteína presente en las hojas.
- ❖ Determinar si hay una asociación entre la cantidad de las distintas isoformas de la Rubisco activasa y la actividad de la Rubisco en distintos momentos del desarrollo de las plantas.

6 METAS

- Adecuar una metodología que permita identificar y cuantificar las proteínas y mRNAs de la Rubisco activasa.
- Caracterizar, en hojas de cebada, el patrón de expresión de las isoformas de las proteínas Rca en 3 estados de desarrollo.
- Determinar el nivel de expresión de cada uno de los mensajeros de las distintas isoformas de *Rca* en hojas de cebada, en los 3 estados de desarrollo elegidos.
- Establecer la relación entre los niveles de las proteína y los mensajero de la Rubisco activasa a lo largo del desarrollo de la planta.
- Cuantificar la actividad de la Rubisco en los 3 estados de desarrollo.

7 METODOLOGÍA

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de este proyecto de investigación se emplearon granos de cebada de una variedad de temporal con 6 hileras de granos, los cuales se sembraron en cajones con 27 litros de sustrato (13 cm de profundidad) con composición: Mezcla 3 de Sunshine®, agrolita y vermiculita en proporción 6:1:1, respectivamente. Se realizó riego cada dos días con agua corriente y una vez a la semana con 1.5 L de solución nutritiva (Nitrógeno 212 ppm, Fósforo 50 ppm, Potasio 236 ppm, Calcio 200 ppm, Magnesio 48 ppm, Azufre 68 ppm, Hierro 4.25 ppm, Manganeso 2.4 ppm, Boro 0.76 ppm, Cobre 0.69 ppm, Zinc 1.35 ppm, Molibdeno 0.012 ppm) en cada cajón.

Para el crecimiento de las plantas se empleó una cámara de cultivo dentro de un invernadero con paredes y techos de vidrio, así como con un sistema de refrigeración intermitente. La temperatura de la cámara fue de aproximadamente 30°C de día y 15°C de noche con fotoperiodo natural.

La recolección de las muestras se realizó el mismo día alrededor de las 13 horas, en un momento en que la luz del sol incidiera perpendicularmente sobre las plantas con una intensidad luminosa entre 12.2 y 14 klux³. Para la realización de este estudio se recolectaron las hojas más jóvenes totalmente desarrolladas en tres etapas diferentes de desarrollo (Zadoks 1.3, 2.0 y 5.3, ver ANEXO II). Las hojas recolectadas fueron cortadas desde la base del tallo, envueltas en papel aluminio, congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C hasta su análisis. Las hojas recolectadas se nombraron respecto al orden de emergencia en las plantas como 2, 5 y 7 tomando 3 plantas de cada etapa.

En la Figura 16 se muestra un ejemplar representativo en cada una de las etapas seleccionadas. Las plantas de las imágenes no fueron empleadas para la realización de los experimentos ya que la recolección de las muestras debió hacerse de forma rápida y congelando de inmediato.

³ El lux es la unidad de intensidad de iluminación del Sistema Internacional, de símbolo lx, que equivale a la iluminación de una superficie que recibe normal y uniformemente un flujo luminoso de 1 lumen por metro cuadrado.

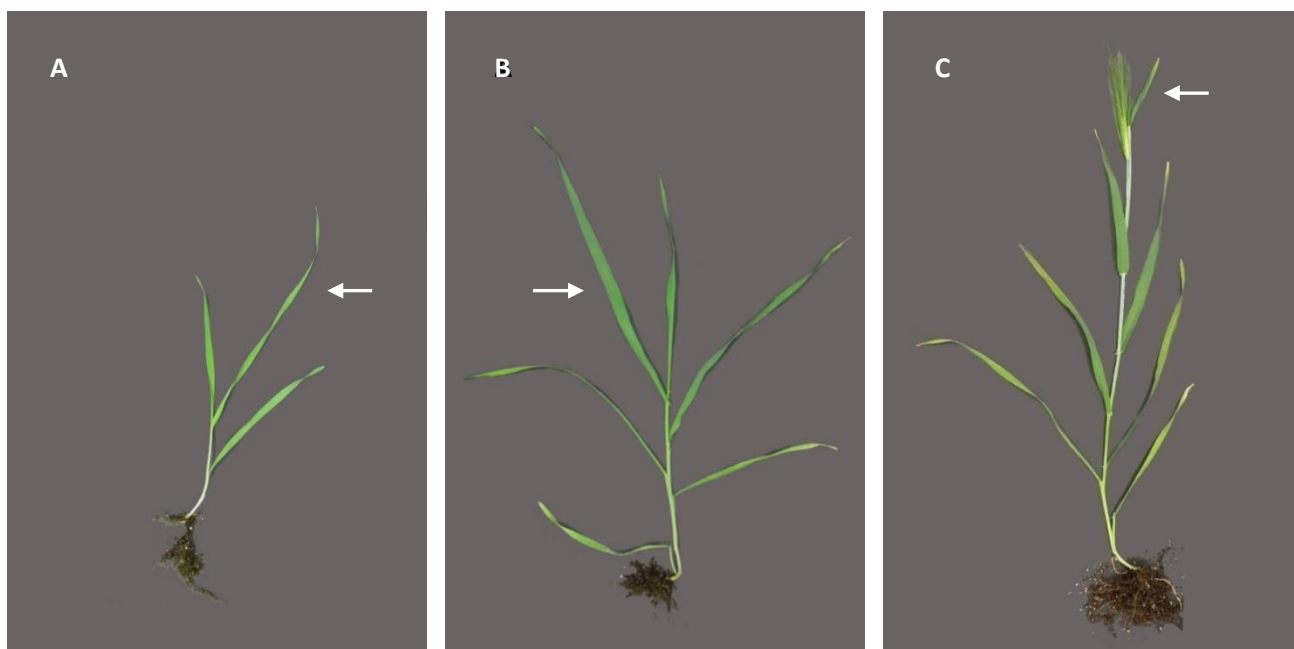


Figura 16. Edad representativa de las plantas empleadas en este trabajo. La hoja recolectada varía dependiendo de la edad de la planta y el número de hoja siempre se cuenta de abajo hacia arriba. A: Planta de la cual se muestreó la hoja 2, B: Planta de la cual se muestreó la hoja 5 y en C: Planta de la cual se muestreó la hoja 7, también llamada 'bandera'. La flecha blanca señala la hoja recolectada.

7.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Cada hoja se trituró en un mortero con pistilo, en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino homogéneo, el cual se depositó cuidadosamente en varios tubos de centrífuga de 1.5 mL para poder tomar solo una parte de la muestra en los casos necesarios. La espátula y los tubos en los cuales se depositó el polvo fueron enfriados previamente con nitrógeno líquido para que la muestra permaneciera congelada durante todo el proceso de manipulación. Los tubos con muestra se mantuvieron a -80°C mientras no se necesitara extraer material de ellos.

Con la finalidad de no pesar las muestras de trabajo -para evitar su descongelamiento- se realizaron algunas pruebas para poder relacionar el volumen que ocupa 0.1 gramos de muestra de hoja triturada y congelada en un tubo de centrífuga con capacidad de 1.5 mL. En esta primera parte se concluyó que 0.25 g de tejido pulverizado ocupa un volumen de 0.5 mL.

Las muestras para análisis se trataron de la siguiente forma: en un tubo de centrífuga de 1.5 mL de capacidad se mezcló muestra de hoja triturada con nitrógeno líquido con buffer de extracción de proteínas (100 mM HEPES–KOH, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 1 mM Na₂–EDTA, Complete® (inhibidor de proteasas de Roche ® usado como especifica el fabricante), 5 mM DTT, 10 mg/mL PVP, 2 mg/mL PEG 4000, 1% (v/v) Triton X-100) (Kubien et al. 2010) empleando aproximadamente 2 mL/gramo de hoja 7, 1.5 mL/gramo de hoja 5 y 1 mL/gramo de hoja 2. La muestra se agitó vigorosamente por algunos segundos, se mantuvo en hielo durante 10 min, se agitó vigorosamente de nuevo y se centrifugó a 21,000x g/4°C durante 5 min para retirar la fibra y conservar la fracción soluble en la cual se cuantificó la cantidad de proteína total, de acuerdo con el método de Bradford, usando el reactivo con #cat 500-0006 de Bio-Rad y BSA (Equitech-Bio, Inc. Cat# BAC62) como estándar. El extracto obtenido se empleó inmediatamente para la determinación del contenido relativo de la Rubisco activasa o para determinar la actividad de la Rubisco.

7.3 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE LA RUBISCO ACTIVASA

De cada una de las etapas de desarrollo elegidas se tomaron tres ejemplares biológicos, y se realizaron triplicados técnicos. De cada muestra se tomaron 7 µg de proteína total y se resolvieron en geles SDS-PAGE de 5.7 cm x 8.3 cm x 1.5 mm y gradientes discontinuos a 2 fases (primer gel separador (1.5 cm) al 12% y segundo gel separador (4.2 cm) al 8%), los geles se cargaron por duplicado para teñir uno y transferir el otro. Se empleó como marcador de peso molecular los estándares de Bajo Rango preteñidos de Bio-Rad® con # cat. 161-0305. Las proteínas separadas en los geles de acrilamida se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon®-P en una cámara sumergida en buffer de transferencia (12.5 mM Tris, 96 mM glicina, 25 mg/L SDS, 20% metanol) a 100 V durante 1 h y en todos los casos se observó que el marcador de peso molecular se transfirió satisfactoriamente a la membrana. Para la detección y cuantificación de la Rubisco activasa se realizó Western Blot bloqueando primeramente la membrana durante 1 h en una solución de leche descremada (marca Svelty®) al 5% en TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH=7.4 con HCl), posteriormente se hibridó con el anticuerpo Anti-Rca (anticuerpo policlonal marca Agrisera® cat # AS10 700 desarrollado empleando a la Rubisco activasa de *Gossypium hirsutum* que presenta entre 73% y 79% de similitud con las distintas isoformas de la Rubisco activasa de cebada (ANEXO I)) en una dilución 1:40,000 en solución bloqueadora sin Tween, se lavó con TBS-T 3 veces durante 7 min para luego hibridar con el segundo anticuerpo IgG-HRP

de cabra anti conejo (marca Santa Cruz Biotechnology® cat# sc-2030) diluido en proporción 1:30,000 en solución bloqueadora sin Tween.

La reacción quimioluminiscente se generó empleando “Luminata Crescendo Western HRP substrate” de Millipore® cat # WBLUR0100 y se registró la señal con el equipo ChemiDoc™ MP System de Bio-Rad.

Los geles que no se transfirieron se tiñeron a temperatura ambiente (TA) en una solución de Metanol al 50%, ácido acético al 10% y azul de Coomassie al 2% en agua durante toda la noche y se destiñeron igualmente a TA en solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% en agua. Las imágenes de los geles se registraron con el equipo arriba mencionado. Las imágenes generadas fueron analizadas en el programa de libre distribución ImageJ® versión 1.45s. Con la finalidad de poder comparar las señales obtenidas entre membranas analizadas por Western Blot se decidió emplear como patrón interno la muestra “Hoja 2, rb1 (réplica biológica 1) en todas las membranas y geles producidos.

7.4 EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA se extrajo empleando el producto de Quiagen® “RNeasy Plant mini Kit”, (Cat No. 74904), con el cual se obtienen mRNAs mayores a 200 pb. En todos los casos, el RNA precipitado se resuspendió en 50 µL de agua inyectable estéril.

7.5 CUANTIFICACIÓN DE RNA

La cuantificación del RNA se realizó a 260 nm, en un equipo espectrofotométrico con una celda de cuarzo. Todas las lecturas de absorbancia se encontraron entre 0.2 y 0.8 unidades y se verificó que la relación A_{260}/A_{280} fuera ≥ 1.8 .

Se confirmó la integridad del RNA cargando alrededor de 500 ng de RNA en un gel de agarosa al 1%, empleando como buffer de corrida el buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH=8.4) y como buffer de carga la siguiente mezcla: 0.03% Xileno Cianol FF, 200 mM MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM Acetato de sodio, 4.5% Formaldehído, 30% Formamida.

7.6 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MENSAJEROS DE LA RUBISCO ACTIVASA

El contenido de mensajeros de la Rubisco activasa se llevó a cabo por RT-PCR semi-cuantitativa en dos pasos, empleando como control interno el rRNA 18S.

Para el desarrollo de esta parte se emplearon 3 réplicas biológicas de cada una de las etapas de desarrollo seleccionadas. No hay réplicas técnicas.

El primer paso (transcripción inversa del RNA/síntesis de cDNA) se llevó a cabo incubando primeramente el RNA con DNasa (Promega cat# M610A), de acuerdo a las especificaciones del fabricante y posteriormente se sintetizó el cDNA con SuperScript® III Transcriptasa Reversa (Invitrogen cat#18080-044) empleando oligo dT₁₈ en concentración 2.5 µM y con de 1.4 µg de RNA por cada 20 µL de reacción.

A pesar de que el rRNA 18S no contiene una cola poli(A) puede amplificarse satisfactoriamente cuando se emplea oligo dT para la síntesis de cDNA (Bogdanović et al. 2013).

El segundo paso (PCR) se realizó empleando el mix de reacción del kit EXPRESS SYBR® GreenER™ (Invitrogen cat#A10314), tomando lo equivalente a 70 ng de RNA por reacción de 20 µL y empleando distintos pares de oligonucleótidos para la amplificación de los transcritos (Tabla 2). En la Figura 17 se muestra la región que reconoce cada oligonucleótido en los mRNAs de *Rca*.

Tabla 2 Resumen de las secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los transcritos de los genes de la Rubisco activasa

Gen	Acceso GenBank	Secuencia de los oligos	Región amplificada (pb)
18S	AY552749.1	Fwd 5'-GGAACTTACCAGGTCCAGACATAG-3' Rvs 5'- GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC-3' Tm de alineamiento: 66°C	210
<i>RcaA1</i> y <i>RcaA2</i>	M55449.1	Fwd 5'-TAAGTAGGATCCATGGCGGAGAACATCGACGAGAAG-3' Rvs 5'-ATGTAGGGATCCTTAAAAGGTGTAAAGGCAGC-3' Tm de alineamiento: 66°C	1251 y 1318
<i>RcaA2</i>	M55447.1	Fwd 5'-CAGTGTGAGCTTGTGTTTCGC" Rvs 5'-TGTGCTCCTTTACCTCCTCC" Tm de alineamiento: 66°C	854
<i>RcaB</i>	M55448.1	Fwd 5'-GCTTGCATATACCACTGCACG-3' Rvs 5'- GAGCTTGTCCATGAATGCCG-3' Tm de alineamiento: 60°C	482

La separación de los transcritos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1.5% cargando 10 µl de producto de PCR. Se documentaron las imágenes de los geles empleando el equipo ChemiDoc™ XRS+ de Bio-Rad®, el análisis de las mismas se realizó mediante el software ImageJ versión 1.50i.

Para la cuantificación de la cantidad de mensajeros presentes en la muestra fue necesario generar cDNA a partir de RNA para posteriormente hacer PCR. A lo largo de este trabajo se hará mención a la amplificación del rRNA y de los mRNAs queriendo decir que se amplificó el cDNA sintetizado a partir de RNA total en la muestra.

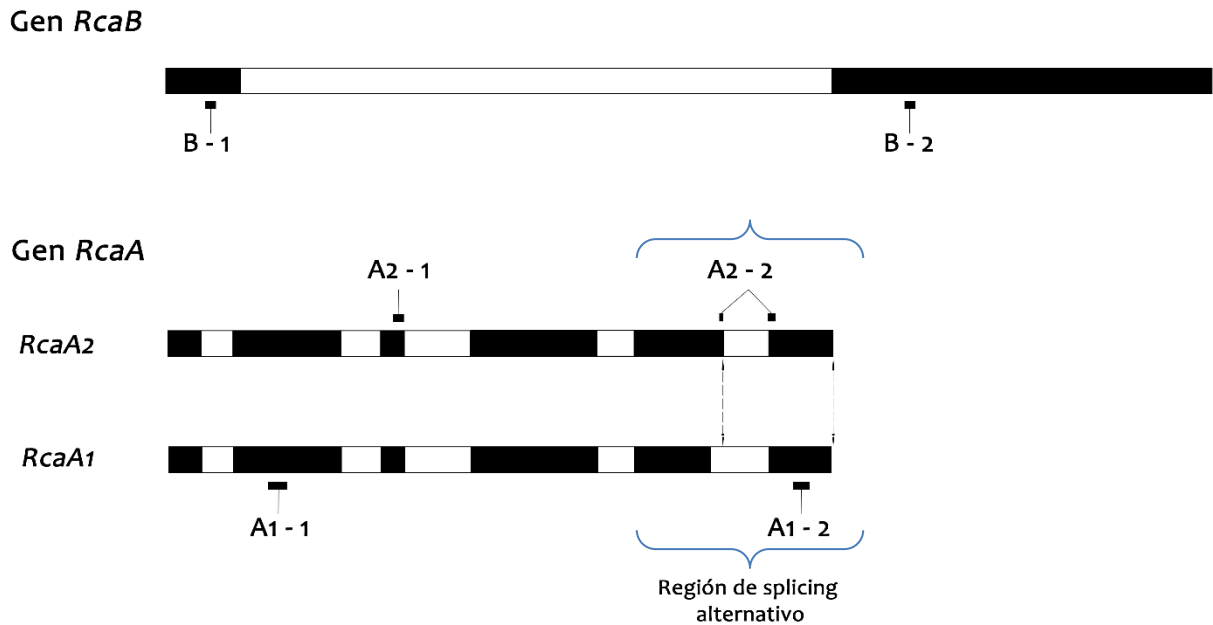


Figura 17 Sitio de unión de los Oligonucleótidos sobre los transcritos de los genes *Rca*. El transcrito del gen *RcaB* se amplificó con los oligonucleótidos B – 1 y B – 2. El gen *RcaA* produce dos transcritos por splicing alternativo de la región señalada con corchetes, el par de oligonucleótidos A2-1 y A2-2 amplificó selectivamente un fragmento del mRNA *RcaA2*, mientras que el par A1-1, A1-2 amplificó tanto el *RcaA1* como el *RcaA2*. Las flechas punteadas entre los dos transcritos *RcaA* recalcan la diferencia entre ambos mRNAs. Los recuadros negros son exones y los blancos intrones.

7.7 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA RUBISCO

Para la determinación de la actividad de Rubisco se emplearon 3 réplicas biológicas y dos réplicas técnicas, con excepción de la Hoja 2 en la que se emplearon 2 réplicas biológicas en lugar de 3. El ensayo se llevó a cabo como se ha reportado previamente (Kubien et al. 2010) con ligeras modificaciones en el buffer de extracción (ver apartado 6.2). Con este experimento se determinó la cantidad de ^{14}C incorporado al azúcar RuBP por la acción de la Rubisco y la Rubisco activasa presentes en los extractos de proteína, obtenidos a partir de las hojas congeladas y pulverizadas. La marca radiactiva empleada fue $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$.

La cuantificación de las proteínas presentes en el extracto acuoso empleado se hizo empleando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar, y en la Tabla 14, ANEXO III, se muestran las ecuaciones de las curvas de calibración.

En la primera parte del ensayo se determinó la actividad inicial de la Rubisco, y en la segunda la actividad total. Cuando se comparan ambos valores de actividad puede conocerse el estado de activación (EA) de la Rubisco. El EA refleja la proporción de la Rubisco que se encuentra activa en el momento de haber realizado la extracción de proteínas. La actividad inicial muestra la actividad de la Rubisco de forma similar a lo que ocurre en las hojas.

La diferencia entre el ensayo de actividad inicial y de actividad total es que en el primero la muestra entró en contacto con la RuBP y el $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ al tiempo = 0 minutos, y en el segundo la muestra se preincubó con $\text{NaH}^{12}\text{CO}_3$ durante 10 min a 25°C , y entró en contacto con la RuBP, el $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ al tiempo = 10 minutos.

Para cada reacción se emplearon 5 μL de muestra (extracto de proteína o extracto de proteína pre-incubado) y 60 μl de mezcla de reacción (88.75 mM Bicine-NaOH, 17.7 mM MgCl_2 , 0.88 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0.5 mM RuBP, 10 mM $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) con tiempo variable de ensayo. La reacción se detuvo con 200 μL de HCl 2 M, se secó en una parrilla a 80°C dentro de una campana de extracción. Los productos estables en ácido se disolvieron con 200 μl de agua inyectable estéril. Las cuentas por minuto generadas fueron amplificadas con solución ACS II ® (Amersham Bioscience cat. #NACS 204) y registradas con un contador de centelleo (Beckman Coulter™ modelo LS 6500).

7.8 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA

Se determinó la cantidad de clorofila en las hojas 2, 5 y 7 usando como buffer de extracción acetona acuosa al 80% con 2.5 mM de sulfato de sodio, pH=7.8 (Porra et al. 1989), empleando las siguientes ecuaciones para los cálculos. El resultado se obtiene en $\mu\text{g/mL}$ para posteriormente hacer los cálculos por efecto de dilución y considerando la masa de la hoja empleada en la extracción:

$$\text{Chl a} = 12.25 A^{663.6 \text{ nm}} - 2.55 A^{646.6 \text{ nm}}$$

$$\text{Chl b} = 20.31 A^{646.6 \text{ nm}} - 4.91 A^{663.6 \text{ nm}}$$

$$\text{Chls a + b} = 17.76 A^{646.6 \text{ nm}} + 7.34 A^{663.6 \text{ nm}}$$

7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con la ayuda de hojas de cálculo del programa Excell 2017 de Microsoft® Office 365.

Para determinar diferencia estadística entre muestras se realizaron comparaciones mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y se calculó el valor WSD (Wholly Significant Difference) propuesto por Tukey con un nivel de significancia estadístico de $p \leq 0.05$. Se realizó el análisis de correlación de Spearman para establecer la correlación entre factores (Volk, 1958).

8 RESULTADOS

8.1 LA EXPRESIÓN DE LA RUBISCO ACTIVASA CAMBIA EN FUNCIÓN DE LA ETAPA DE DESARROLLO

La integridad de las proteínas presentes en el extracto acuoso empleado se verificó mediante la tinción de los geles producidos por la separación electroforética de proteínas donde se aprecia que no hay proteólisis evidente (Figuras 24, 26, 28 y 30, ANEXO III).

La detección de la Rubisco activasa (Rca) mediante Western Blot permitió identificar en todas las muestras, además de las isoformas α y β , una proteína con un peso aproximado de 39 kDa (Figura 25, 27, 29 y 31, ANEXO III)) que no ha sido descrita como isoforma de la Rca con anterioridad, pero que en este trabajo se considera como una de ellas y así se hará referencia a ella. La distribución de las isoformas varía dentro de las hojas de cebada: las isoformas β de 42 kDa representan el 69%, 66% y el 68% en la Hoja 2, Hoja 5 y Hoja 7, respectivamente; la isoforma de 39 kDa representa el 23%, 27%, y el 15% en la Hoja 2, Hoja 5 y Hoja 7, respectivamente, mientras que la isoforma α de 46 kD contribuye en 7%, 7% y en 17% en la Hoja 2, Hoja 5 y Hoja 7, respectivamente (Tabla 8, ANEXO III). Los datos de cada determinación pueden consultarse en la Tabla 9 (ANEXO III).

Para poder determinar la significancia de la variación en los datos se analizaron mediante ANOVA y con la prueba de Tukey (WSD) (Tabla 10 y Tabla 11 en ANEXO III). La comparación de la cantidad de Rubisco activasa Total (Figura 18, Tabla 10 en ANEXO III) mostró que no existe diferencia significativa entre las distintas hojas analizadas. El análisis de la variación del contenido de Rubisco activasa por isoformas muestra que éstas se encuentran en cantidades muy diferentes dentro de una misma hoja e independientemente de la hoja analizada la banda más intensa fue aquella de 42 kDa donde hay una mezcla de dos isoformas β . La cantidad de proteína de 42 kDa —producto de la expresión de dos genes— no varía entre hojas con diferente etapa de desarrollo (Figura 18, Tabla 11 en ANEXO III). La isoforma de 46 kDa varía significativamente ($p \leq 0.05$) entre hojas de diferente etapa de desarrollo, siendo mayor su cantidad en la Hoja 7 donde se encuentra aproximadamente al doble respecto a las hojas 5 y 2. La isoforma de 39 kDa se detectó a lo largo del desarrollo; en ocasiones en forma superior a la de 46 kDa, y aunque parece

haber cambios en su expresión no resultan ser significativamente diferentes por la dispersión de los datos.

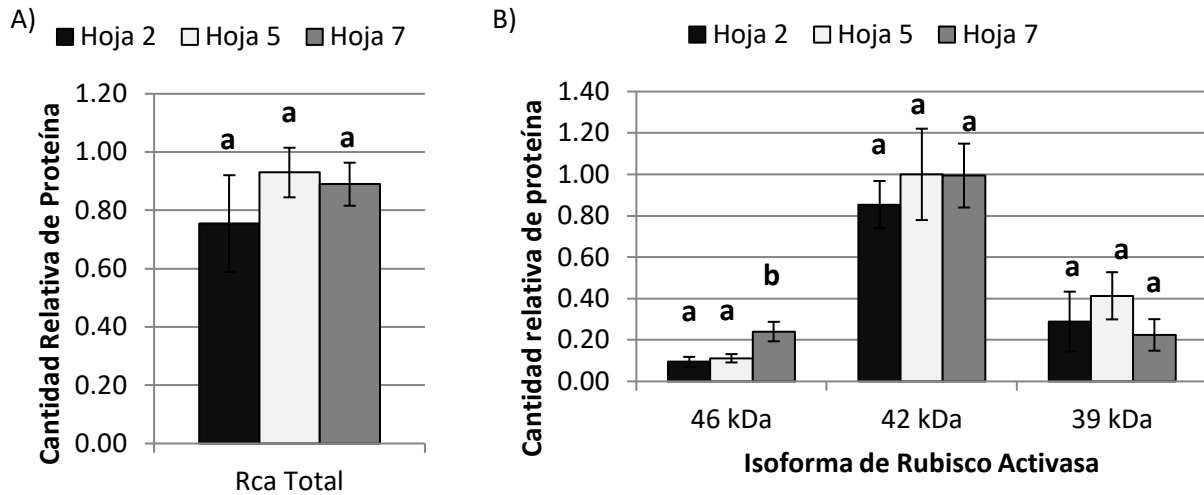


Figura 18 Cantidad relativa de Rubisco activasa en hojas de cebada.

A) Cantidad de Rubisco activasa Total en las distintas hojas analizadas. B) Cantidad de las isoformas de Rubisco activasa en las distintas hojas analizadas. La isoforma de 39 kDa es una isoforma putativa ya que no ha sido reportada previamente. Los datos fueron generados a partir de Western Blots anti-Rca; la cantidad es relativa al valor más alto de contenido de Rubisco activasa

El contenido total de la Rubisco activasa (Figura 18) tiende a incrementarse en las hojas 5 y 7 pero las diferencias no son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Para conocer si la expresión diferencial de las distintas isoformas de la Rca está dada por efectos transcripcionales se analizó la cantidad de los mRNAs (*RcaA1*, *RcaA2* y *Rca B*) que codifican para las distintas isoformas de cebada ya reportadas con anterioridad (Rca de 46 kDa y 42 kDa) mediante RT-PCR semi-cuantitativa.

8.2 LOS NIVELES DE LOS RNA MENSAJEROS DE LA RUBISCO ACTIVASA VARÍAN EN LAS DISTINTAS HOJAS ANALIZADAS

Antes de la realización de esta parte del trabajo se confirmó la integridad de las muestras de RNA empleadas (Figura 32, ANEXO III). La amplificación de los transcritos de la Rubisco activasa se llevó a cabo con tres pares de oligonucleótidos (sección 7.5 en Metodologías), uno de los pares amplificó tanto el mRNA *RcaA1* como el *RcaA2*, los otros dos pares fueron específicos para *RcaA2* y *RcaB*. El análisis de los transcritos se realizó con distintos ciclos de la PCR —seleccionados a partir de curvas de amplificación (Figura 33, Figura 34, Figura 35)— eligiéndose 30 ciclos para *RcaA1*+*RcaA2* (Figura 36, ANEXO III), 25 ciclos para *RcaA2*

(Figura 37, ANEXO III), 45 ciclos para *RcaB* (Figura 38, ANEXO III) y 25 ciclos para el control de amplificación 18S. La información generada no permite hacer una comparación entre genes ya que cada par de oligonucleótidos podría tener distinta eficiencia (no calculada), además de generar transcritos con diferente longitud por lo que solamente se compararán los cambios dentro de un mismo RNA. La cantidad de los transcritos cambia entre hojas, teniéndose para todos los casos un mínimo en la Hoja 5 (Tabla 12, ANEXO III y Figura 19). La señal de amplificación de *RcaA1+RcaA2* fue menor que la obtenida al amplificar *RcaA2*. Este hecho llama la atención puesto que la intensidad debería haber sido al menos de la misma por tratarse de la suma de dos mRNAs. Para obtener la distribución aproximada de la isoforma *RcaA1* en las distintas hojas de cebada considerando el hecho anterior, arbitrariamente se duplicó el valor de *RcaA1+RcaA2* para restársele el valor de *RcaA2*. La desviación estándar de la señal de *RcaA1* en cada hoja se calculó obteniendo la raíz cuadrada de la suma del cuadrado de las desviaciones de *RcaA1+RcaA2* y *RcaA2* (Figura 20). Tanto *RcaB* como *RcaA1* muestran niveles máximos en la Hoja 7, mientras que *RcaA2* lo hace en la Hoja 2. Puede consultarse la información estadística en la Tabla 13, dentro del ANEXO III.

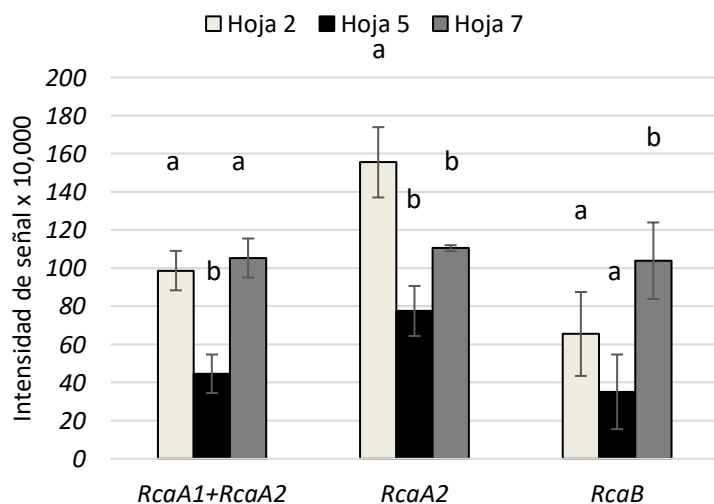


Figura 19 Niveles de mRNA de las distintas isoformas de la Rubisco activasa en hojas de cebada.

La cuantificación de la intensidad de la señal se realizó con distintos ciclos de amplificación para cada mensajero; *RcaA1+RcaA2* con 30 ciclos, *RcaA2* con 25 ciclos y *RcaB* con 45 ciclos. Los datos se normalizaron respecto al rRNA 18S con 25 ciclos de amplificación. La comparación entre hojas para un mismo mensajero se realizó mediante ANOVA y prueba de Tukey (WSD) con $p \leq 0.05$, letras diferentes indican diferencia significativa.

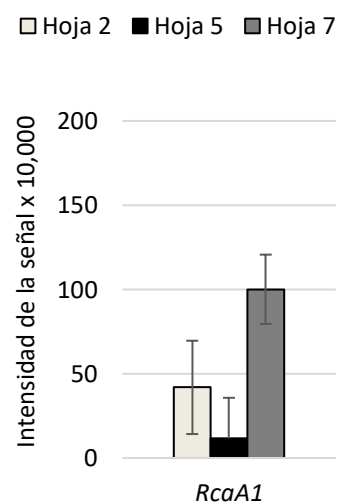


Figura 20 Proporción estimada de la cantidad de los mRNAs *RcaA1* en comparación con *RcaA1+RcaA2*. Los valores de la intensidad de la señal no tienen relación con aquellos de la Figura 19.

8.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA RUBISCO

La actividad de la Rubisco está modulada por la Rubisco activasa (ver sección 3.4). La actividad inicial es máxima en la hoja 7 de cebada y mínima en las Hojas 2 y 5 (Tabla 15, ANEXO III y Figura 21). La actividad total es máxima en la Hoja 7 (Tabla 16, ANEXO III) sin embargo, el análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa entre hojas (Tabla 17, ANEXO III)

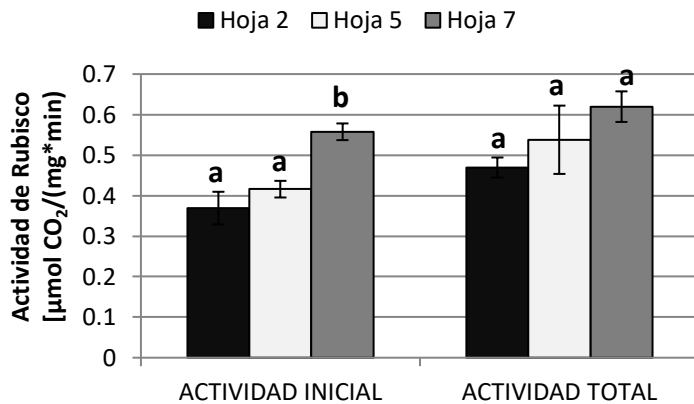


Figura 21 Actividad de la Rubisco *in vitro*. Se determinó la actividad de la Rubisco *in vitro* en hojas de cebada en distintas edades fisiológicas de las plantas. La actividad inicial se midió luego de mezclar extracto de proteína con $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ en presencia de magnesio y RuBP en una solución amortiguada, la actividad total se determinó de forma similar con la diferencia de que el extracto de proteínas se incubó previamente con $\text{NaH}^{12}\text{CO}_3$ (ver materiales y métodos para mayor detalle). Letras diferentes denotan diferencia significativa al 95% de confianza, determinada mediante la prueba WSD de Tukey.

La actividad total de la Rubisco es un dato que permite conocer en cierta medida el grado de activación que tiene la Rubisco en las hojas; al cociente de la actividad inicial sobre la actividad total se le conoce como “Estado de Activación” y da a conocer la eficacia con la que la Rubisco activasa activa a la Rubisco. En la Tabla 3 se muestran los valores correspondientes al estado de activación de la Rubisco en cada una de las hojas analizadas.

Tabla 3 Estado de activación. Parámetro que resulta de dividir el valor de la actividad inicial sobre el de la actividad total.

	Estado de activación
Hoja 2	0.79
Hoja 5	0.77
Hoja 7	0.90

8.4 CANTIDAD DE CLOROFILA

La cantidad de clorofila en las hojas de las plantas está relacionada con la integridad del sistema fotosintético (Jenjins et al. 1981), con el flujo electrónico en la fase luminosa de la fotosíntesis (Govindjee et al. 2010), con el estado de salud de la planta (Mur et al. 2010).

La clorofila *a* está presente en todas las hojas analizadas con una relación clorofila *a*/clorofila *b* cercana a 4.5; alcanza la mayor concentración en la Hoja 7 y la menor en la Hoja 2. La concentración tanto de la clorofila *a* como la de la clorofila *b* aumenta cerca del doble en la Hoja 7 con respecto a las Hojas 2 y 5 (Tabla 18, ANEXO III y Figura 22) con significancia estadística (Tabla 19 y Tabla 20)

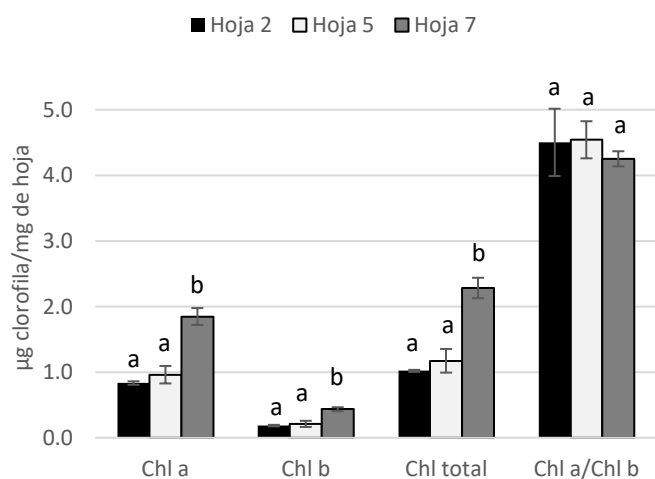


Figura 22 Cantidad de clorofila en hojas de cebada.

Letras diferentes dentro del mismo grupo denotan diferencia estadísticamente significativa con una $p \leq 0.05$. Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba de Tukey (WSD).

Chl a=clorofila *a*, Chl b=clorofila *b*, Chl total=clorofila total

8.5 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE DATOS

Una vez determinada la cantidad de la Rubisco activasa total y parcial en función de sus isoformas, la cantidad de transcritos de los genes *Rca*, la cantidad de clorofila en las hojas y la actividad inicial y total de la Rubisco se realizó un análisis de correlación de Spearman. Los grados de libertad empleados para determinar significancia estadística variaron dependiendo de las correlaciones debido a la pérdida de muestras durante los ensayos. Los valores críticos del coeficiente de correlación de Spearman (r_s) empleados para determinar significancia estadística se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4 Valores críticos del coeficiente de correlación de Spearman para pruebas a dos colas (Zar, 1984)

Grados de libertad	$p < 0.1$	$p < 0.05$
5	0.900	1.000
6	0.829	0.886
7	0.714	0.786

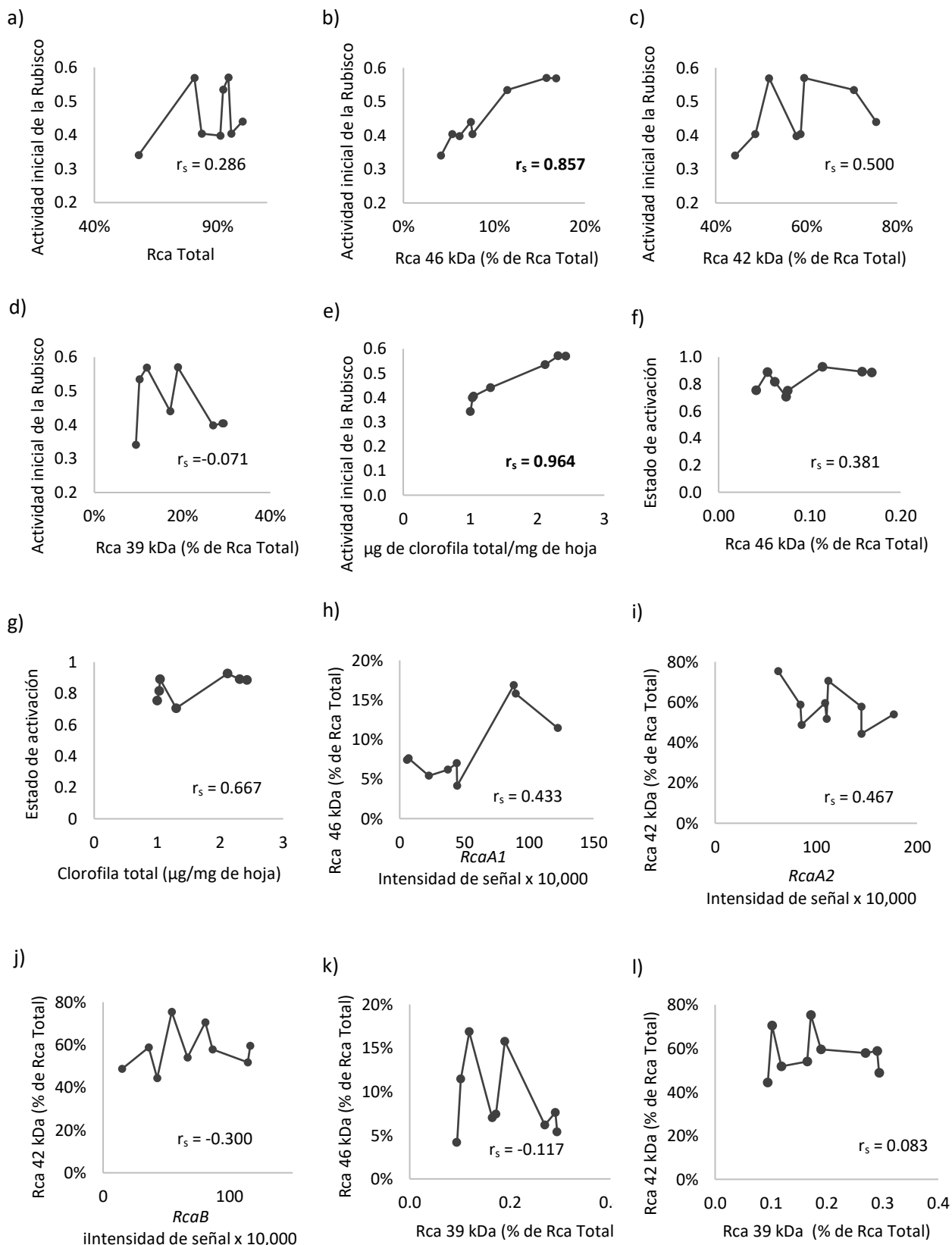
El análisis de correlación entre la actividad inicial de la Rubisco y la cantidad de las proteínas de la Rubisco activasa muestra que únicamente hay significancia estadística ($p \leq 0.1$) con la

isoforma de 46 kDa donde el coeficiente de correlación fue de 0.857 (Tabla 5, Figura 23-b) sin embargo, el estado de activación de la Rubisco no tiene correlación con la Rubisco activasa. El contenido de clorofila total mostró una fuerte correlación positiva con la actividad de la Rubisco (Tabla 5, Figura 23-e). No existe correlación significativa entre el contenido de las proteínas de la Rubisco activasa y la cantidad de mensajero presente (Tabla 5, Figura 23-h,i,j). La isoforma de 39 kDa no presenta correlación con alguna de las variables analizadas.

Tabla 5 Análisis de correlación de Spearman (r_s) entre variables. El valor r_s resultante se presenta en la intersección de las variables, es adimensional, con valor positivo si la relación es directa y negativo si la relación es inversa. Se omiten las unidades de las variables ya que ello no modifica el valor calculado. Los valores con significancia estadística con $p \leq 0.1$ se remarcan en negritas. Entre paréntesis '()' se indican los grados de libertad.

VARIABLES	Rca 46 kDa	Rca 42 kDa	Rca 39 kDa	Rca Total	Clorofila total
Actividad Inicial de la Rubisco	0.857 (6)	0.500 (6)	-0.071 (6)	0.286 (6)	0.964 (5)
Actividad total de la Rubisco	0.929 (6)	0.571 (6)	-0.143 (6)	0.381 (6)	0.929 (5)
Estado de activación	0.381 (6)	0.000 (6)	-0.071 (6)	-0.262 (6)	0.667 (5)
Rubisco activasa 39 kDa	-0.117 (7)	0.083 (7)			
Mensajero <i>RcaA1</i>	0.433 (7)		-0.600 (7)		
Mensajero <i>RcaA2</i>		-0.467 (7)	-0.550 (7)		
Mensajero <i>RcaB</i>		-0.300 (7)	-0.300 (7)		

Figura 23 Correlación entre variables. La actividad inicial de la Rubisco está dada en unidades de $\mu\text{mol CO}_2 / (\text{min} \cdot \text{mg proteína})$, “Rca” se refiere a la proteína Rubisco activasa, mientras que *Rca* se refiere al mRNA de la Rubisco activasa. r_s es el coeficiente de correlación de Spearman. En negritas se resaltan los valores con significancia estadística con $p \leq 0.1$.



9 DISCUSIÓN

De todos los tejidos fotosintéticos (hojas, tallos, órganos verdes de flores estériles, raíces aéreas y estructuras reproductivas), las hojas son las que principalmente contribuyen a la fijación de CO₂ atmosférico para distribuirlo en el resto de la planta (Aschan & Pfanz, 2003). En los cereales, de entre todas las hojas, la hoja bandera es la que mayormente contribuye al llenado de grano (Evans & Dunstone, 1970) y es por ello que en este estudio fue fundamental realizar determinaciones en la hoja bandera (Hoja 7). El estudio quizá hubiera sido más específico si se hubiera empleado tejido fotosintético de la espiga, además de las hojas, ya que se ha visto que tiene una contribución más importante en el llenado de grano y en la biomasa en los brotes que la propia hoja bandera (Abbad et al. 2004; Tambussi et al. 2007), sin embargo, en la gran mayoría de trabajos en los que se estudia la Rubisco activasa en plantas, se emplean las hojas por su facilidad de estudio, porque han permitido obtener resultados comparables entre grupos de trabajo y porque los datos generados permiten apreciar tendencias claras y significativas de lo que ocurre en las plantas.

Las plantas son organismos responsivos a cambios en el medio ambiente (e.g. temperatura ambiental, cantidad de nutrientes, luz, humedad) que pueden provocar alteraciones importantes en la expresión de sus genes y su metabolismo. Para asegurarnos de que no hubiera más variables en el estudio que la edad de la hoja, se sembraron las plantas con un calendario escalonado previendo que en una misma semana pudieran ser recogidas las muestras. Se regaron todas las plantas al mismo tiempo con la misma solución o agua y se recolectaron a la misma hora del día.

Para la realización de este trabajo se emplearon plantas de cebada por su importancia comercial. El objetivo principal fue determinar los niveles de transcritos y proteínas de las isoformas de la Rubisco activasa (Rca) en distintos estados de desarrollo y su asociación con la actividad de la Rubisco.

La expresión de la Rubisco activasa de 46 kDa cambia durante el desarrollo de las plantas de cebada.

La cantidad de la Rubisco activasa total varía en las distintas etapas del desarrollo de las plantas de cebada, habiendo una tendencia a incrementarse en las hojas 5 y 7 aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). En este trabajo se cuantificaron juntas las dos isoformas Rca β ya que el anticuerpo empleado fue un anticuerpo policlonal que reconoció ambas isoformas por lo que no fue posible detectar cambios de expresión entre las dos isoformas de 42 kDa (Figura 25, Figura 27, Figura 29, Figura 31, ANEXO III). De todas las proteínas de la Rca detectadas, la isoforma de 46 kDa es la única que modificó significativamente su expresión a lo largo del desarrollo de la planta y representó casi el 17% del contenido total de Rca (Tabla 8, ANEXO III) en la Hoja 7, cantidad que equivale a más del doble de lo que se encuentra en las otras dos hojas. La isoforma de 39 kDa se encontró en mayor cantidad en las hojas 5 de cebada, respecto a las hojas 2 y 7, pero no de manera significativa y se registró de manera similar con las isoformas de 42 kDa (Figura 18). El origen de la isoforma de 39 kDa es desconocido y no ha sido reportada con anterioridad en cebada, sin embargo se ha visto en otras especies la aparición de una nueva isoforma originada presumiblemente por proteólisis (Zielinski et al. 1989; Crafts-Brandner et al. 1997; Law & Crafts-Brandner, 2001; Vargas-Suárez et al. 2004). Para descartar que la proteólisis ocurriera durante la manipulación de la muestra se emplearon inhibidores de proteasas en el buffer de extracción de proteínas y se trabajó en condiciones adecuadas.

El incremento de una de las isoformas de la Rca en una etapa avanzada de desarrollo es consistente con lo que se ha visto previamente. Al igual que en este trabajo, Wang y otros (2009) mostraron en plantas de arroz que la relación Rca α /Rca β se incrementa en las hojas superiores de la planta, sin embargo se ha visto que en el último tercio de hojas de plantas de maíz la isoforma que aumenta es la Rca β (Yin et al. 2014). A diferencia del estudio con maíz en este trabajo se emplearon las hojas completas y no una porción de ellas a sabiendas de que la expresión de la Rca es heterogénea dentro de una misma hoja e influye mucho en el análisis la porción analizada (Zielinski et al. 1989), es probable que el aumento de diferentes isoformas se deba a la porción de hoja analizada, a que son plantas con diferente metabolismo —cebada es C3 y maíz es C4—, a diferencias metodológicas, u otros factores.

La $Rca\alpha$ es una isoforma con relevancia para la supervivencia de las plantas. En arroz se ha visto que $Rca\alpha$ tiene más elementos cis de respuesta a estrés que la isoforma $Rca\beta$ por lo que ante condiciones de estrés la isoforma que más se incrementa es la primera (Chen et al. 2015), con lo que se acentúa el papel diferencial que puede tener cada una de las isoformas de Rca .

Los niveles de los mRNA de la Rubisco activasa no están relacionados con la cantidad de proteína

Previamente Rundle & Zielinski (1991a) predijeron la existencia de 3 proteínas de Rca en cebada que proceden de 2 genes. El gen $RcaA$ genera dos transcritos producidos por *splicing* alternativo: $RcaA1$ y $RcaA2$, que generan proteínas de 46 kDa y 42 kDa respectivamente. El gen $RcaB$ genera un solo transcrito que da origen a una proteína de 42 kDa.

En este trabajo se midió la cantidad de mRNA de Rca mediante RT-PCR semicuantitativa. La técnica empleada permitió determinar la cantidad relativa de un mismo transcrito en diferentes hojas de cebada, resultó inadecuada para la comparación entre transcritos.

Las plantas se hicieron crecer con una intensidad luminosa entre 12 y 14 kLux que aproximadamente corresponde a 216 y 252 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (PAR) (Biggs, 2004). La relación entre la clorofila a y la clorofila b puede permanecer constante en una planta si se le mantiene con la misma intensidad luminosa (Bojović & Stojanović 2005), o con un adecuado aporte de nitrógeno (Kitajima y Hogan, 2003; Jinwen et al. 2009) aunque también puede estar en función de la etapa de desarrollo en que se encuentre (Simova-Stoilova et al. 2001). La cantidad de clorofila determinada se encontró dentro de límites normales (Avramov et al. 2007; Jinwen et al. 2009) y la relación clorofila a /clorofila b permaneció invariable en las distintas hojas analizadas (Figura 22).

Los niveles de transcritos de las distintas isoformas de Rca fueron diferentes en cada una de las hojas (Figura 19, Figura 20). La Hoja 5 de cebada exhibió en todos los casos los menores niveles de expresión debido quizá a que al ser más larga que la Hoja 2 o la Hoja 7 creció hacia arriba y se dobló en el tercio cercano a la punta y probablemente la cantidad de luz recibida fue diferente a la de las otras hojas disminuyendo así la cantidad de los transcritos (Rundle & Zielinsky, 1991b) modificando también la distribución de las isoformas

que manifiestan un gradiente a lo largo de las hojas (Zielinski et al. 1989). La disminución en la cantidad de transcritos en la Hoja 5 podría explicarse también por el hecho de que después de la emergencia de las hojas la cantidad de los transcritos de la *Rca* varían de un día a otro de forma significativa (Yamaoka et al. 2016) por lo que si el muestreo no se realizó en el mismo estado fisiológico —a pesar de que visualmente así pareció— podrían apreciarse niveles diferentes de los mRNAs.

El hecho de que la relación clorofila *a*/clorofila *b* permaneció invariable en todas las hojas podría significar que el plegamiento de las Hojas 5 no fue suficiente para que la cantidad de luz incidente fuera diferente a las Hojas 2 y 7 o que el nitrógeno suplementado en la solución de riego disminuyó el efecto de la luz sobre las clorofilas pero sí afectó la transcripción de la *Rca*

Los transcritos *RcaB* tienen niveles máximos en la Hoja 7 (Figura 19, Tabla 12 en ANEXO III). La mezcla de transcritos del gen *RcaA* (*RcaA1*+*RcaA2*) tiene niveles similares en la Hoja 2 y la Hoja 7, no así los transcritos producidos por splicing alternativo —*RcaA1* y *RcaA2*— quienes tienen comportamiento opuesto entre sí: mientras *RcaA1* alcanza un máximo en la Hoja 7, *RcaA2* lo hace en la Hoja 2. La diferencia en los niveles de transcritos producidos por splicing alternativo podría deberse a factores postranscripcionales que favorezcan la estabilidad de los transcritos. La longitud de los UTR está relacionada con la vida media de los transcritos (DeRidder & Salvucci, 2007; DeRidder et al. 2012) y aunque en cebada no se han detectado variantes de splicing en la región 3'-UTR de las isoformas de *Rca* es probable que sea un mecanismo de regulación como ocurre en otras especies (Ayala-Ochoa et al. 2004; DeRidder et al. 2012; Park et al. 2012; Yin et al. 2014).

Con el fin de conocer si los niveles de transcritos están relacionados con la cantidad de proteína, se sometieron los datos a un análisis de correlación de Spearman. La cantidad de los mRNAs de los genes *RcaA* y *RcaB* no presentó correlación significativa con la cantidad de las proteínas correspondientes (Tabla 5, Figura 23). Para *Rca* de 46 kDa se encontró una relación positiva, más no significativa ($r_s=0.433$) con su mRNA correspondiente, *RcaA1*. Se comparó la cantidad de proteína de 42 kDa con *RcaA2* ($r_s=-0.467$) y con *RcaB* ($r_s=-0.300$) más no existió correlación estadística ($p \leq 0.1$ y $p \leq 0.05$). Se sabe que los niveles de mRNA de *Rca* cambian debido a factores como la cantidad de luz (Rundle & Zielinsky, 1991), la hora del día (Chao et al. 2014), la presencia de elementos estresantes (Law & Crafts-Brandner, 2001; Leitao et al. 2007; Bilgin et al. 2010; Chao et al. 2014), la edad de la hoja

(Yamaoka et al. 2016) o la posición de la hoja dentro de la planta (Yin et al. 2014), y aunque la síntesis *de novo* de las proteínas Rca está relacionada positivamente con los niveles de sus respectivos mRNAs (Martino-Catt & Ort, 1992; Law & Crafts-Brandner, 2001) la cantidad de proteínas de Rca permanece casi invariable incluso cuando cambian los niveles de mRNA (Law et al. 2001; Vargas-Suárez et al. 2004; Wang et al. 2009; Yin et al. 2014) debido a la estabilidad de la proteína (Zielinski et al. 1989; DeRidder et al. 2012). En este trabajo las muestras fueron cultivadas y cosechadas en idénticas condiciones para minimizar los cambios en los niveles de RNA por las condiciones experimentales; lo más probable es que la falta de correlación entre mRNA y proteína se deba a la gran estabilidad de la proteína.

La actividad de la Rubisco se relaciona directamente con la cantidad de clorofila y de la Rca de 46 kDa

Medir la actividad de la Rubisco es una forma indirecta de determinar la capacidad fotosintética de una planta, a pesar de que las mediciones *in vitro* pueden ser inferiores a las determinadas *in vivo* debido a una inadecuada extracción de proteínas (Rogers et al. 2001), sin embargo las mediciones siguen la misma tendencia en ambos casos.

En este trabajo se trabajó con extractos de proteína obtenidos minutos antes de los ensayos para evitar pérdida de actividad. Entre hojas, la actividad inicial de la Rubisco fue mayor en la Hoja 7 y se correlacionó positiva y significativamente ($r_s = 0.857$) con la cantidad de la Rca de 46 kDa y con el contenido de clorofila (clorofila total, $r_s = 0.964$). Sin embargo el estado de activación de la Rubisco no tuvo relación con el contenido total de la Rca ($r_s = -0.262$) ni con alguna de sus isoformas ($r_s = 0.381$ para Rca de 46 kDa) (Tabla 5). Los resultados aquí obtenidos son consistente con los determinados previamente en otros trabajos donde la Rubisco activasa se asoció con la tasa fotosintética (Morales et al. 1999; Masumoto et al. 2012; Yin et al. 2014) pero no con el estado de activación de la Rubisco que se vió mínimamente alterado por el contenido de la Rca (Fukayama et al. 2012) a menos que este disminuyera alrededor de 50% respecto a plantas control (Yamori y von Caemmerer, 2009; Yamori et al. 2012). El contenido de clorofila también se ha asociado positivamente con una mayor tasa fotosintética (Buttery & Buzzell, 1977; Zhenqi et al. 1984). La actividad total de la Rubisco cambió entre hojas alcanzando un máximo en la Hoja 7 e igualmente se relacionó con el contenido de clorofila ($r_s = 0.929$) y con el contenido de la Rubisco activasa de 46 kDa ($r_s = 0.929$). El ensayo de actividad total de la Rubisco refleja

la cantidad de CO₂ fijado por unidad de tiempo. La Rca es un factor clave para la activación de la Rubisco (Streusand & Portis, 1987; Lilley & Portis, 1990) pero también la tasa de fijación del CO₂ está relacionada con la concentración de la Rubisco (Fukayama et al. 2012) que cambia de forma similar a como lo hace la Rca (Wang et al. 2009) (Yamaoka et al. 2016).

La fotosíntesis puede verse limitada por la disminución de la tasa de transporte de electrones (ETR) en los fotosistemas, por la capacidad de la Rubisco de carboxilar a la RuBP, o por la capacidad de las regeneración de la RuBP en el ciclo de Benson-Basham-Calvin (Farquhar et al. 1980). La medición *in vitro* de la actividad de la Rubisco podría reflejar limitaciones en la ETR y en la tasa de carboxilación de la RuBP más no en la tasa de regeneración. Bajo las condiciones de este estudio, el transporte electrónico asociado con el sistema fotosintético no limita la fijación de CO₂ (Yamori et al. 2008).

10 CONCLUSIONES

El contenido total de las proteínas de la Rubisco activasa permanece constante a lo largo del desarrollo de plantas de cebada de la variedad empleada sin embargo, la proporción de cada una de las isoformas detectadas por WB presenta ligeras variaciones en las Hojas 2 y 5 sin ser estadísticamente significativas.

La hoja bandera u Hoja 7 tiene aproximadamente 2.5 veces más contenido de Rca de 46 kDa que el resto de las hojas.

La actividad de la Rubisco es máxima en la Hoja 7 (Hoja Bandera), y tiene relación positiva con el contenido de la Rubisco activasa de 46 kDa y la cantidad de clorofila.

La expresión de la proteína presente en las hojas no es un reflejo de la cantidad de los mRNAs de Rca.

11 ANEXO I

Alineamiento realizado con ClustalW de la secuencia de las diversas isoformas de la Rubisco activasa de cebada con la secuencia de *Gosypum hirsutum* (algodón) empleada para producir el enticuerpo de la marca Agrisera®, Uniprot: Q9AXG1

```

Cebada_RcaA1      MAAAFSST-----VGAPASTP-TNFLGKKLKKQVTSAVNYHG-KSSKANRFTV 46
Cebada_RcaA2      MAAAFSST-----VGAPASTP-TNFLGKKLKKQVTSAVNYHG-KSSKANRFTV 46
Cebada_RcaB       MASAFSST-----VGAPASTP-TIFLGKKVKN-----YYHGGNKMKSRVVRV 41
Algodón           MAAAVSTIGAVNRAPLSLNGSGAGASAPSSAFMGNLKK-VSARFNNNG--KAPVGSFKI 57
                  **:*.*:          ** **:* : *:.:.*:          :* . . . :

Cebada_RcaA1      MAAEN-IDE--KRNTDKWKGLAYDISDDQQDITRGKGI VDSL FQAPTGHGTHEAVLSSYE 103
Cebada_RcaA2      MAAEN-IDE--KRNTDKWKGLATDISDDQQDITRGKGI VDSL FQAPTGDGTHEAVLSSYE 103
Cebada_RcaB       MAAKKELDQGKQTDADRWKGLAYDISDDQQDITRGKGI VDSL FQAPMGDGTHEAILSSYE 101
Algodón           VAAKE-IDEDTQTDQDRWKGLAYDISDDQQDITRGKGMVDSL FQAPMNDGTHYAVMSSYE 116
                  :*: : * : : * :***** *****:***** ..** *::****

Cebada_RcaA1      YVSQGLRKYDFDNTMGGFYIAPAFMDKLVVHLSKNFMTLPNIKIPLILGIWGGKGQGKSF 163
Cebada_RcaA2      YVSQGLRKYDFDNTMGGFYIAPAFMDKLVVHLSKNFMTLPNIKIPLILGIWGGKGQGKSF 163
Cebada_RcaB       YISQGLRKYDFDNTMDGLYIAPAFMDKLIVHLAKNFMTLPNIKVPLILGIWGGKGQGKSF 161
Algodón           YISQGLRKYDFDNTMGGFYIAPAFMDKLVVHITKNYMTLPNIKVPLILGIWGGKGQGKSF 176
                  *:***** .*:*.*.*.*:*****:*.*:*.*:*****:*****

Cebada_RcaA1      QCELVFAKMGINPIMMSAGELESGNAGEPAKLIRQRYREAADM IKKGMCCLFINDLDAG 223
Cebada_RcaA2      QCELVFAKMGINPIMMSAGELESGNAGEPAKLIRQRYREAADM IKKGMCCLFINDLDAG 223
Cebada_RcaB       QCELVFAKMGINPIMMSAGELESGN-GEP AKLIRQRYREAADI INKGMCCLFINDLDAG 220
Algodón           QCELVFAKMGINPIMMSAGELESGNAGEPAKLIRQRYREAADI INKGMCCLFINDLDAG 236
                  *****:*****:*****:*****

Cebada_RcaA1      AGRMGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADAPTNVQLP GMYNKRENPRVPIIVTGNDFSTLYAP 283
Cebada_RcaA2      AGRMGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADAPTNVQLP GMYNKRENPRVPIIVTGNDFSTLYAP 283
Cebada_RcaB       AGRMGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADAPTNVQLP GMYNKEENPRVPIIVTGNDFSTLYAP 280
Algodón           AGRMGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPTNVQLP GMYNKEENPRVPIIVTGNDFSTLYAP 296
                  ***** ***** .*****:*****

Cebada_RcaA1      LIRDGRMEKFYWAPTRDDRIGVCKGIFQTDNVSD ESVVKIVDTFPGQSIDFFGALRARVY 343
Cebada_RcaA2      LIRDGRMEKFYWAPTRDDRIGVCKGIFQTDNVCDE SVVKIVDTFPGQSIDFFGALRARVY 343
Cebada_RcaB       LIRDGRMEKFYWAPTREDRIGVCKGIFRTDNV PDEAVVRLVDTFPGQSIDFFGALRARVY 340
Algodón           LIRDGRMEKFYWAPTREDRIGVCTGIFRTDNV PVDIVKLVDTFPGQSIDFFGALRARVY 356
                  *****:***** .*:*.*: : :*:*****

Cebada_RcaA1      DDEVKRWVGSTGIENIGKRLVNSRDGPVTFEQPKMTVEK LLEYGHMLVQE QDNV KRVQLA 403

```

```

Cebada_RcaA2      DDEVKRWVSGSTGIENIGKRLVNSRDGPVTFEQPKMTVEKLLLEYGHMLVQEQDNVQKRVQLA 403
Cebada_RcaB      DDEVKRWVGEIGVENISKRLVNSREGPPTFDQPKMTIEKLMYGHMLVQEQENVKRVQLA 400
Algodón          DDEVKRWIGEVGVNSVGKLVNSREGPPSFEQPTMTIEKLLLEYGNMLVAEQENVKRVQLA 416
                  *****:* . *: : . : . *: *****:* * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *****
                  * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * .

Cebada_RcaA1      DTYMSQAALGDANQDAMKTGSFYGKGAQQGTLFPVPEGCTDQNAKNYDPTARSDDGSCLYT 463
Cebada_Rca2      DTYMSQAALGDANQDAMKTGSFYG----- 427
Cebada_RcaB      DKYLSEAALGQANDDAMKTGAFYGK----- 425
Algodón          DKYLSEAALGNANDDAIKRGAF----- 438
                  * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * . *: * .

Cebada_RcaA1      F 464
Cebada_Rca2      -
Cebada_RcaB      -
Algodón_1        -

```

Tabla 6. Similitud entre secuencias de la Rubisco activasa de cebada (RcaA1, RcaA2, RcaB) y la de algodón. Se compararon las secuencias arriba mostradas.

	Algodón	RcaA1	RcaA2	RcaB
Algodón		73.29%	75.18%	79.06%
RcaA1	73.29%		99.30%	84.71%
RcaA2	75.18%	99.30%		84.47%
RcaB	79.06%	84.71%	84.47%	

12 ANEXO II

Tabla 7 Etapas del desarrollo de cebada y su correspondencia en código Zadoks y Feekes (Simmons et al. 1995)

Código de Zadoks		Descripción	Correspondencia código Feekes
Estado principal	Estado secundario		
0		Germinación	
	0	Grano seco	
	1	Principio de la imbibición (absorción de agua)	
	5	Emergencia de la radícula	
	7	Emergencia del coleoptilo	
	9	Hojas en la punta del coleoptilo	
1		Desarrollo de la plántula	1
	0	Primera hoja a través del coleoptilo	
	1	Emergencia al menos del 50% de la primera hoja	
	2	Emergencia al menos del 50% de la segunda hoja	
	3	Emergencia al menos del 50% de la tercera hoja	
	4	Emergencia al menos del 50% de la cuarta hoja	
	5	Emergencia al menos del 50% de la quinta hoja	
2		Crecimiento de las cañas	
	0	Brote principal solo	
	1	Brote principal más 1 caña visible	2
	2	Brote principal más 2 cañas visibles	
	3	Brote principal más 3 cañas visibles	
	4	Brote principal más 4 cañas visibles	
	5	Brote principal más 5 cañas visibles	3
3		Elongación del tallo	
	1	Primer nudo detectable	6
	2	Segundo nudo detectable	7
	3	Tercer nudo detectable	
	7	Hoja bandera recién nacida	8
	9	Hoja bandera con collar apenas visible	9
4		Bota	
	1	Lámina de hoja bandera en crecimiento	
	3	Bota justo antes del hinchado	
	5	Hinchado de la bota	10
	7	Apertura de la lámina de la hoja bandera	
	9	Primeras aristas visibles	
5		Emergencia de la cabeza	
	1	Primera espiguilla o cabeza visibles	10.1
	3	Un cuarto de cabeza emergida	10.2
	5	La mitad de la cabeza emergida	10.3
	7	Tres cuartos de la cabeza emergida	10.4
	9	Emergencia de la cabeza completa	10.5
6		Floración (no visible realmente en cebada)	
	1	Comienzo de la floración	10.5.1
	5	La mitad de las floretas han florecido	10.5.2
	9	Floración completa	10.5.3
7		Desarrollo lechoso en el grano	
	1	Maduración acuosa del grano	10.5.4
	3	Lechoso temprano	
	5	Lechoso medio	11.1
	7	Lechoso tardío	
8		Desarrollo de la pasta del grano	
	3	Pasta temprana	
	5	Pasta suave	11.2
	7	Pasta dura, la cabeza pierde color verde	
	9	Aproximación madurez fisiológica	
9		Maduración	
	1	Endurecimiento del grano	11.3
	2	Grano totalmente maduro	11.4

13 ANEXO III

13.1 DATOS GENERADOS EN LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

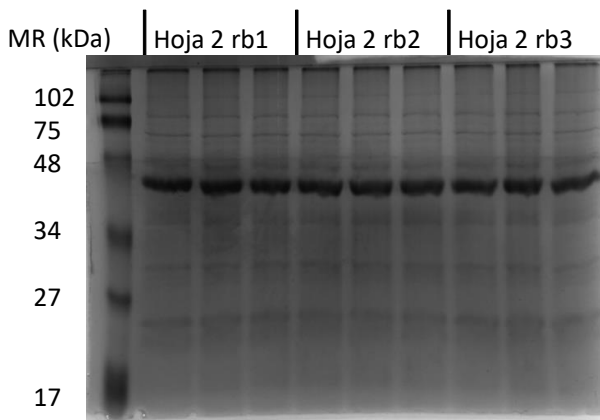


Figura 24 Separación electroforética de proteínas (7 μ g por carril) de hojas 2 de cebada en gel de acrilamida discontinuo. El gel se tiñó con azul de coomassie disuelto en metanol y ácido acético.

rb= Réplica Biológica

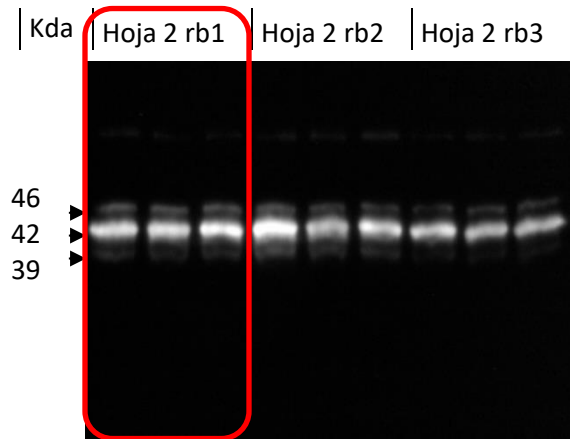


Figura 25 Detección de la Rubisco activasa por Western Blot en las hojas 2 de plantas de cebada. Proteína total de hoja (7 μ g) se separaron en un gel de poliácridamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se encierra en un rectángulo las muestras que se seleccionaron como patrón interno para el análisis de datos.

rb= Réplica Biológica

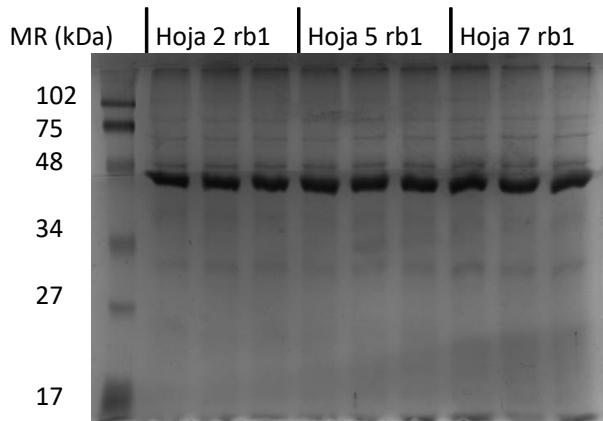


Figura 26 Separación electroforética de proteínas (7 μ g por carril) de hojas 2, 5 y 7 de cebada en gel de acrilamida discontinuo. El gel se tiñó con azul de coomassie disuelto en metanol y ácido acético.

rb= Réplica Biológica

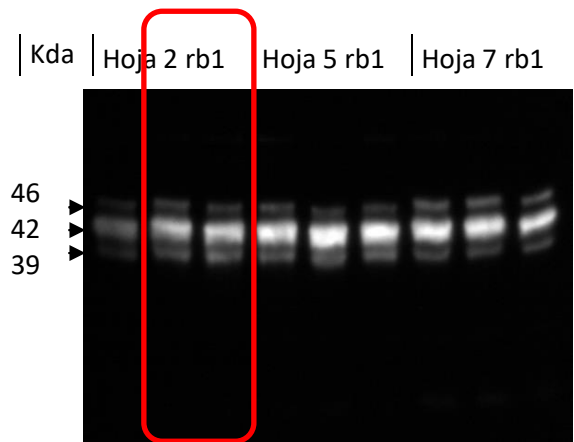


Figura 27 Detección de la Rubisco activasa por Western Blot en hojas 2, 5 y 7 de plantas de cebada. Proteína total de hoja (7 μ g) se separaron en un gel de poliácridamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se encierra en un rectángulo las muestras que se seleccionaron como patrón interno para el análisis de datos.

rb= Réplica Biológica

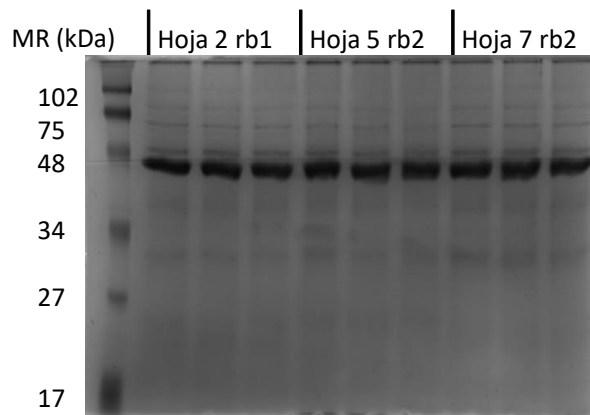


Figura 28 Separación electroforética de proteínas (7 μ g por carril) de hojas 2, 5 y 7 de cebada en gel de acrilamida discontinuo. El gel se tiñó con azul de coomassie disuelto en metanol y ácido acético.

rb= Réplica Biológica

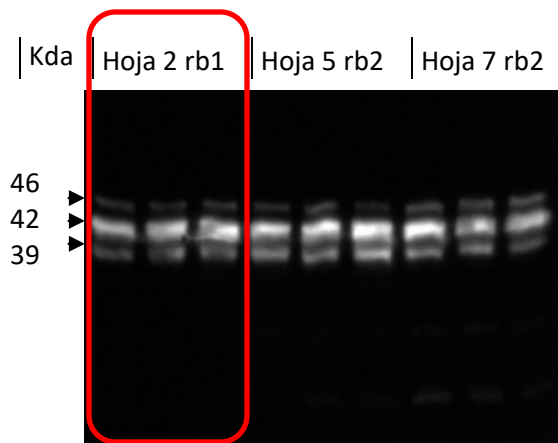


Figura 29 Detección de la Rubisco activasa por Western Blot en hojas 2, 5 y 7 de plantas de cebada. Proteína total de hoja (7 μ g) se separaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se encierra en un rectángulo las muestras que se seleccionaron como patrón interno para el análisis de datos.

rb= Réplica Biológica

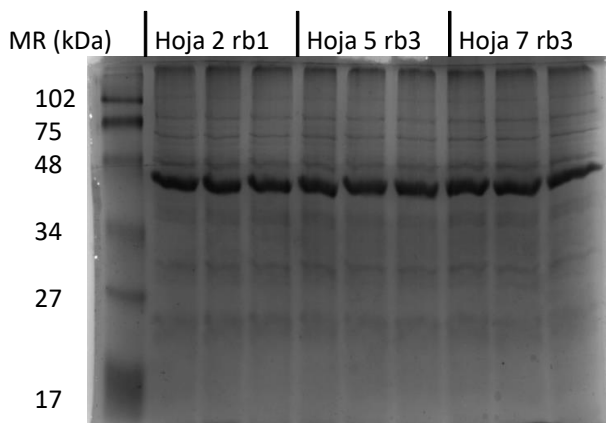


Figura 30 Separación electroforética de proteínas (7 μ g por carril) de hojas 2, 5 y 7 de cebada en gel de acrilamida discontinuo. El gel se tiñó con azul de coomassie disuelto en metanol y ácido acético.

rb= Réplica Biológica

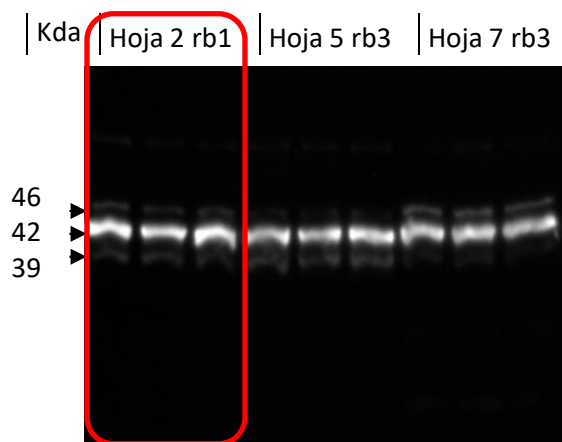


Figura 31 Detección de la Rubisco activasa por Western Blot en hojas 2, 5 y 7 de plantas de cebada. Proteína total de hoja (7 μ g) se separaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se encierra en un rectángulo las muestras que se seleccionaron como patrón interno para el análisis de datos.

rb= Réplica Biológica

Tabla 8 Distribución de cada una de las isoformas de Rubisco activasa en las distintas hojas de cebada analizadas. Los porcentajes son relativos al contenido total de Rubisco activasa en cada una de las hojas. Los valores se calcularon a partir de la detección de Rubisco activasa mediante Western Blot.

	46 kDa	42 kDa	39 kDa
Hoja 2	7.7%	69.0%	23.4%
Hoja 5	7.3%	65.6%	27.1%
Hoja 7	16.5%	68.1%	15.4%

Tabla 9 Tabla resumen del contenido de Rubisco activasa en hojas de cebada, cada dato que se presenta es el resultado del promedio del triplicado técnico. Los valores han sido estandarizados respecto al valor de las réplicas del control interno empleado (réplica biológica 1 de muestra de hoja 2) y expresados aquí como relativos al valor máximo observado (réplica biológica 1 de Hoja 5)

	HOJA 2			HOJA 5			HOJA 7		
Réplica biológica	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Rca Total									
Cantidad relativa	0.910	0.579	0.775	1.000	0.835	0.954	0.805	0.922	0.942
promedio	0.754 ± 0.167			0.930 ± 0.085			0.890 ± 0.074		
cv%	22.00%			9.00%			8.00%		
Isoforma 46 kDa									
Cantidad relativa	0.062	0.042	0.070	0.074	0.054	0.076	0.168	0.114	0.158
promedio	0.058 ± 0.014			0.068 ± 0.012			0.147 ± 0.029		
cv%	25.00%			18.00%			20.00%		
Isoforma 42 kDa									
Cantidad relativa	0.578	0.443	0.540	0.754	0.487	0.588	0.518	0.705	0.595
promedio	0.520 ± 0.069			0.610 ± 0.134			0.606 ± 0.094		
cv%	13.00%			22.00%			16.00%		
Isoforma 39 kDa									
Cantidad relativa	0.269	0.094	0.165	0.172	0.294	0.291	0.119	0.102	0.190
promedio	0.176 ± 0.088			0.252 ± 0.69			0.137 ± 0.046		
cv%	50.00%			28.00%			34.00%		

Tabla 10 Análisis de Varianza (ANOVA) del contenido de la Rubisco activasa total en hojas de cebada. A la derecha se muestra la tabla de diferencias; si el valor de alguna de las intersecciones es superior al WSD calculado, refleja diferencia significativa al 95% de confianza, y se resalta en negritas.

ANÁLISIS DE VARIANZA. CONTENIDO DE RUBISCO
ACTIVASA **TOTAL**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.05062	2	0.02531
INTRA HOJAS	0.08054	6	0.01342
TOTAL	0.13116	8	

TABLA DE DIFERENCIAS

	HOJA 2	HOJA 5	WSD calculada: 0.2930
HOJA 7	0.1352	0.0401	
HOJA 5	0.1753		

Tabla 11 Análisis de Varianza (ANOVA) del contenido de Rubisco activasa de 46, 42 y 39 kDa en hojas de cebada. A la derecha se muestra la tabla de diferencias; si el valor de alguna de las intersecciones es superior al WSD calculado, refleja diferencia significativa al 95% de confianza, y se resalta en negritas.

ANÁLISIS DE VARIANZA. CONTENIDO DE RUBISCO
ACTIVASA DE **46 kDa**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.01423	2	0.00712
INTRA HOJAS	0.00237	6	0.00040
TOTAL	0.01660	8	

TABLA DE DIFERENCIAS

	HOJA 2	HOJA 5	WSD calculada: 0.0523
HOJA 7	0.0890	0.0787	
HOJA 5	0.0103		

ANÁLISIS DE VARIANZA. CONTENIDO DE RUBISCO
ACTIVASA **42 kDa**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.01529	2	0.00765
INTRA HOJAS	0.06358	6	0.01060
TOTAL	0.07887	8	

TABLA DE DIFERENCIAS

	HOJA 2	HOJA 5	WSD calculada: 0.2603
HOJA 7	0.0856	0.0036	
HOJA 5	0.0892		

ANÁLISIS DE VARIANZA. CONTENIDO DE RUBISCO
ACTIVASA **39 kDa**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.02059	2	0.01029
INTRA HOJAS	0.02949	6	0.00491
TOTAL	0.05008	8	

TABLA DE DIFERENCIAS

	HOJA 2	HOJA 5	WSD calculada: 0.1773
HOJA 7	0.0394	0.1153	
HOJA 5	0.0758		

13.2 CUANTIFICACIÓN DE RNAS

INTEGRIDAD DE RNA

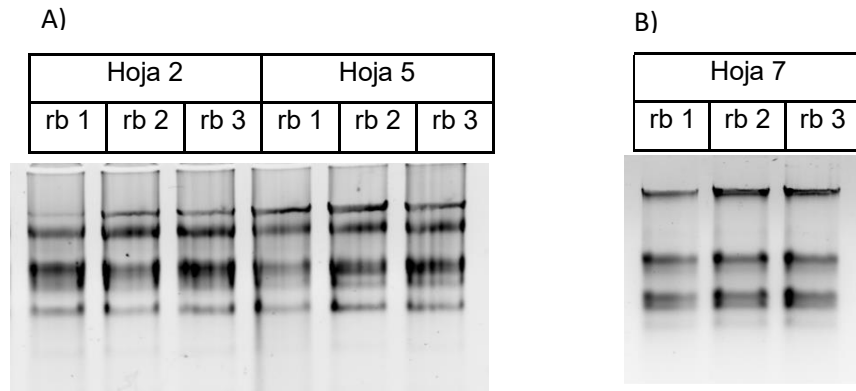


Figura 32 RNA de hojas de cebada.

Las muestras de RNA de las hojas 2 y 5 (A) se separaron en un gel de agarosa al 1.5% en TAE, mientras que las muestras de RNA de la Hoja 7 (B) en un gel de agarosa al 2%. En todos los casos la extracción se realizó con el kit RNeasy de Quiagen®. La carga por pozo es de aproximadamente 500 ng
rb: réplica biológica

HOJA 2. CURVAS DE AMPLIFICACIÓN DE RNA

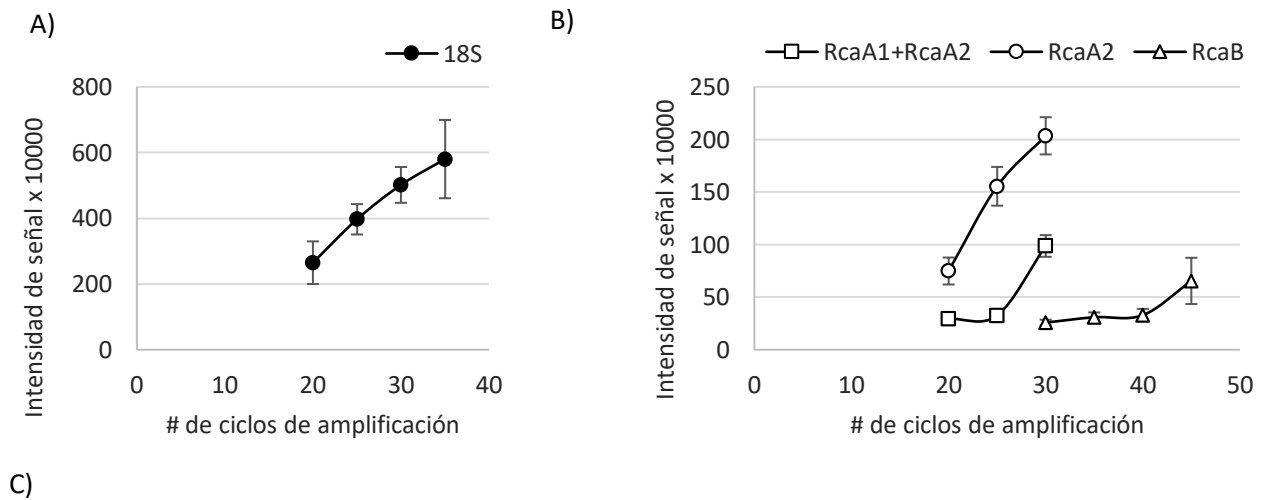


Figura 33 Análisis de transcritos en la Hoja 2 de cebada. Curvas de amplificación de los rRNAs *18S* (A) con valores sin normalizar, y de los transcritos de los genes de cebada (B) con valores normalizados con respecto a la señal del amplicón del *18S* con 25 ciclos de amplificación. Cada dato representa el promedio de un triplicado biológico.

En la tabla (C) se muestra la imagen de una de las réplicas de amplificación para cada transcrito analizado.

HOJA 5. CURVAS DE AMPLIFICACIÓN DE RNA

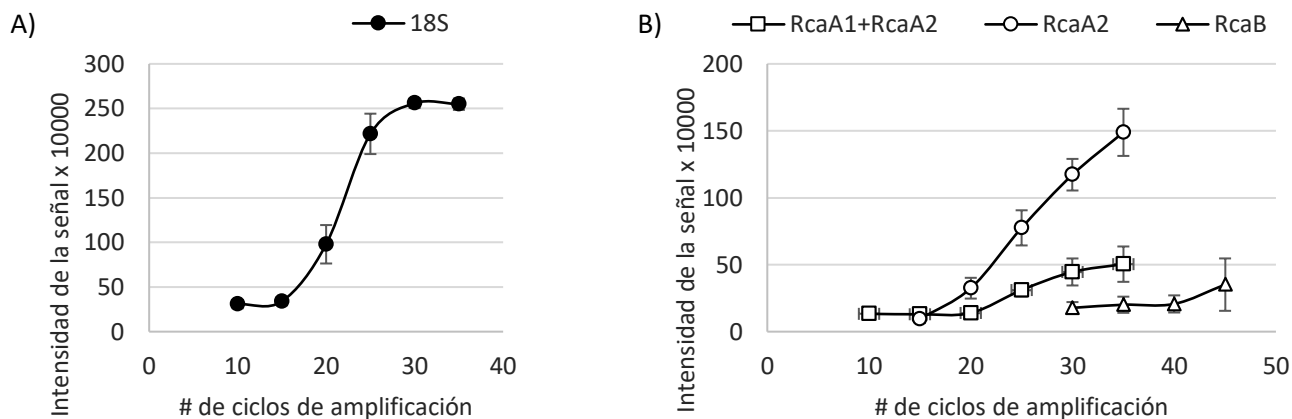


Figura 34 Análisis de transcritos en la Hoja 5 de cebada. Curvas de amplificación de los rRNAs *18S* (A) con valores sin normalizar, y de los transcritos de los genes de cebada (B) con valores normalizados con respecto a la señal del amplicón del *18S* con 25 ciclos de amplificación. Cada dato representa el promedio de un triplicado biológico.

En la tabla (C) se muestra la imagen de una de las réplicas de amplificación para cada transcrito analizado.

C)

Transcrito	# de ciclos de amplificación							
	10	15	20	25	30	35	40	45
<i>18S</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for 18S]							
<i>RcaA1+RcaA2</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for RcaA1+RcaA2]							
<i>Rca2</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for Rca2]							
<i>RcaB</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for RcaB]							

HOJA 7. CURVAS DE AMPLIFICACIÓN DE RNA

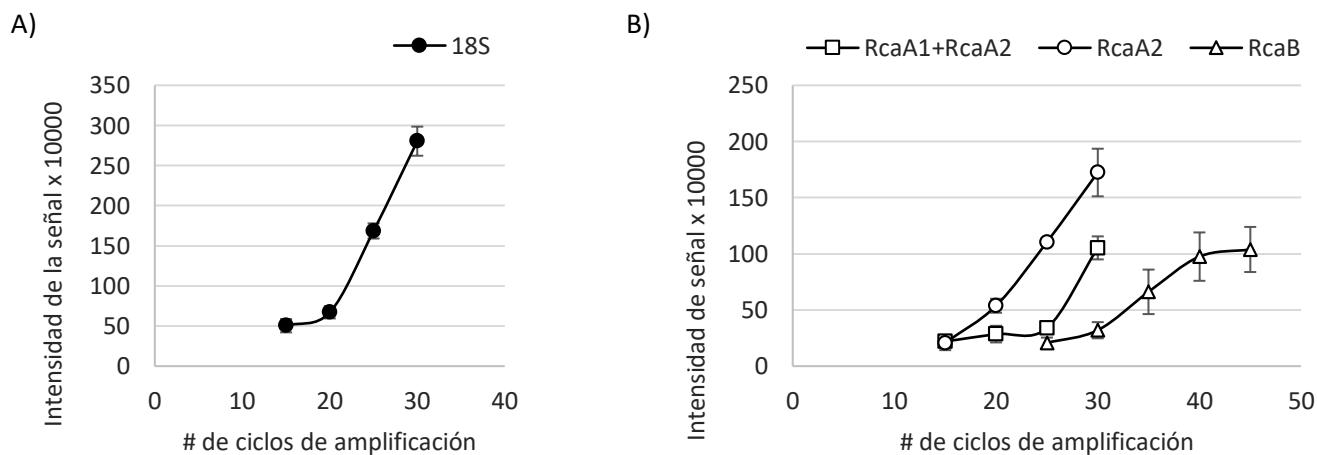


Figura 35 Análisis de transcritos en la Hoja 7 de cebada. Curvas de amplificación de los rRNAs *18S* (A) con valores sin normalizar, y de los transcritos de los genes de cebada (B) con valores normalizados con respecto a la señal del amplicón del *18S* con 25 ciclos de amplificación. Cada dato representa el promedio de un triplicado biológico.

En la tabla (C) se muestra la imagen de una de las réplicas de amplificación para cada transcrito analizado.

C)

Transcrito	# de ciclos de amplificación						
	15	20	25	30	35	40	45
<i>18S</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for 18S]						
<i>RcaA1+RcaA2</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for RcaA1+RcaA2]						
<i>Rca2</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for Rca2]						
<i>RcaB</i>	[Gel electrophoresis image showing bands for RcaB]						

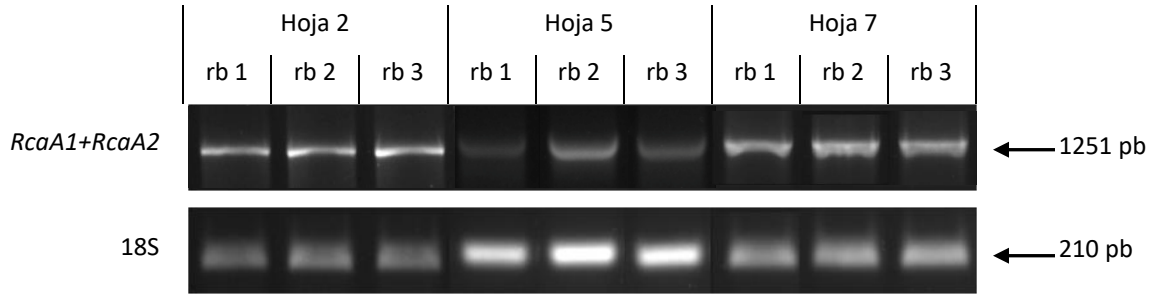


Figura 36 Separación electroforética (1.5% agarosa) de los amplicones de los transcritos *RcaA1+RcaA2*. Como control de amplificación se empleó el rRNA18S. Se muestra el triplicado biológico empleado para el análisis de la expresión en las distintas hojas a 30 ciclos de amplificación de PCR. rb= réplica biológica

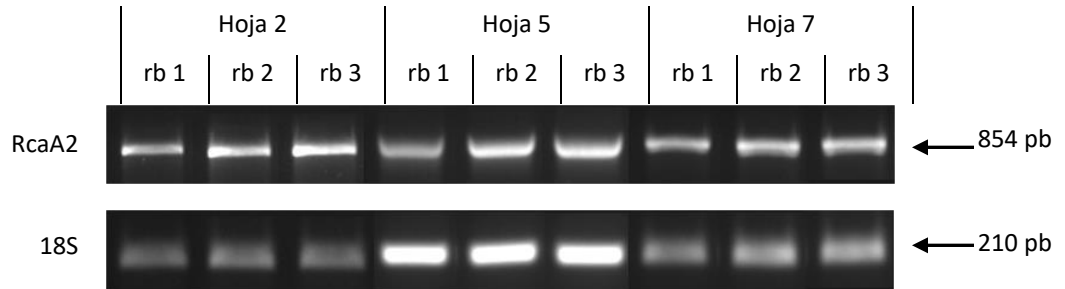


Figura 37 Separación electroforética (1.5% agarosa) de los amplicones de los transcritos *RcaA2*. Como control de amplificación se empleó el rRNA18S. Se muestra el triplicado biológico empleado para el análisis de la expresión en las distintas hojas a 25 ciclos de amplificación de PCR. rb=réplica biológica

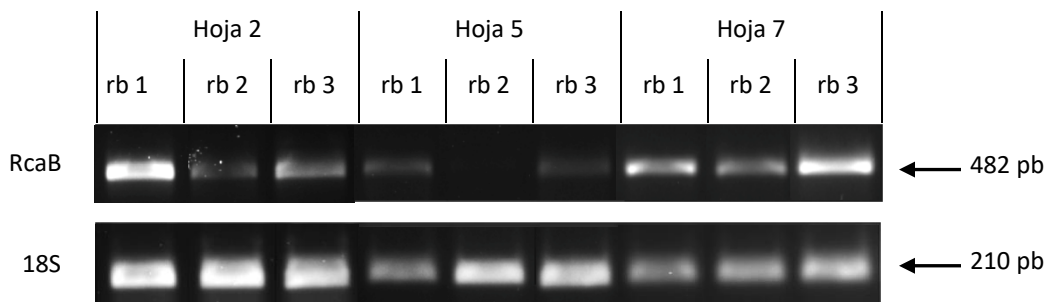


Figura 38 Separación electroforética (1.5% agarosa) de los amplicones de los transcritos *RcaB*. Como control de amplificación se empleó el rRNA18S. Se muestra el triplicado biológico empleado para el análisis de la expresión en las distintas hojas a 45 ciclos de amplificación de PCR. rb=réplica biológica

Tabla 12 Resumen del contenido de los transcritos de Rubisco activasa en hojas de cebada. Los valores han sido estandarizados respecto al control de amplificación 18S con 25 ciclos de la PCR. Los valores están dados en unidades adimensionales de intensidad de señal. El número entre paréntesis es el número de ciclos de la PCR que se tomaron para el estudio. CV%= Coeficiente de variación en porcentaje.

Réplica biológica	HOJA 2			HOJA 5			HOJA 7		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	RcaA1+RcaA2 (30)								
Señal	910045	946226	1104367	339373	540056	457919	993953	1171193	993141
cv%	10%			23%			10%		
	RcaA2 (25)								
Señal	1447443	1449341	1767615	623791	856262	845439	1105313	1119560	1088597
cv%	12%			17%			1%		
	RcaB (45)								
Señal	866962	427689	668997	542102	151016	360533	1144469	807131	1164444
cv%	34%			56%			19%		

Tabla 13 Análisis de Varianza (ANOVA) del contenido de los transcritos *RcaA1+RcaA2*, *RcaA2* y *RcaB* en hojas de cebada. A la derecha se muestra la tabla de diferencias. Si el valor de alguna de las intersecciones es superior al WSD calculado, se resalta en negritas e indica diferencia significativa al 95% de confianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA. mRNA RcaB			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	6.65 x 10 ¹¹	2	3.27 x 10 ¹¹
INTRA HOJAS	6.28 x 10 ¹⁰	6	1.05 x 10 ¹¹
TOTAL	7.28 x 10 ¹¹	8	

TABLA DE DIFERENCIAS			
	HOJA 2	HOJA 5	WSD calculada: 258623
HOJA 7	65883	606980	
HOJA 5	541097		

ANÁLISIS DE VARIANZA. mRNA RcaA2			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	9.19 x 10 ¹¹	2	4.59 x 10 ¹¹
INTRA HOJAS	1.02 x 10 ¹¹	6	1.71 x 10 ¹⁰
TOTAL	1.02 x 10 ¹²	8	

TABLA DE DIFERENCIAS			
	HOJA 2	HOJA 5	WSD calculada: 331080
HOJA 7	450309	329326	
HOJA 5	779635		

ANÁLISIS DE VARIANZA. mRNA RcaA1+RcaA2			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	7.12 x 10 ¹¹	2	3.56 x 10 ¹¹
INTRA HOJAS	2.54 x 10 ¹¹	6	4.23 x 10 ¹⁰
TOTAL	9.66 x 10 ¹¹	8	

TABLA DE DIFERENCIAS			
	HOJA 2	HOJA 5	WSD calculada: 520322
HOJA 7	384132	687465	
HOJA 5	303332		

13.3 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO

Tabla 14 Ecuaciones de las curvas patrón empleadas para la cuantificación de las proteínas en los extractos empleados en los ensayos de actividad de Rubisco. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de Bradford y empleando BSA como estándar.

ACTIVIDAD A DETERMINAR	ECUACIÓN DE LA LÍNEA RECTA	r ²
Inicial	y = 0.068x + 0.005	0.999
Total	y = 0.057x + 0.018	0.990

Tabla 15 Actividad Inicial de Rubisco. Se muestran los datos generados durante la determinación *in vitro* de la actividad, mediante la fijación de ¹⁴C. Cada dato es el resultado del promedio de la réplica técnica. Se perdió una muestra de las Hojas 2 por lo que solamente se cuenta con duplicado biológico. CPM =Cuentas por minuto, CV= Coeficiente de variación entre réplicas.

Muestra	Réplica biológica	mg proteína total x10 ⁻²	Tiempo de reacción (min)	CPM Promedio	μmol CO ₂ fijado	Actividad promedio [μmol CO ₂ /(min*mg proteína)]	CV
Marca NaH ¹⁴ CO ₃	0	0	0	466652.4	0.6		
Hoja 2	1	1.47	4	18142.2	0.023	0.369 ± 0.40	10.90 %
	2	1.81	4	19173.2	0.025		
Hoja 5	1	2.03	3	20830	0.027	0.416 ± 0.021	4.90%
	2	2.01	3	19015	0.024		
	3	1.63	3	15354.8	0.02		
Hoja 7	1	2.05	1.5	13632.4	0.018	0.558 ± 0.021	3.70%
	2	2.68	1.5	16675.4	0.021		
	3	2.72	1.5	18063.4	0.023		

Tabla 16 Actividad Total de Rubisco. Se muestran los datos generados durante la determinación *in vitro* de la actividad, mediante la fijación de ¹⁴C. Cada dato es el resultado del promedio de la réplica técnica. Se perdió una muestra de las hojas 2 por lo que solamente se cuenta con duplicado biológico. CPM= Cuentas por minuto, CV= Coeficiente de variación entre réplicas.

Muestra	Réplica biológica	mg proteína total x10 ⁻²	Tiempo de reacción (min)	CPM Promedio	μmol CO ₂ fijado	Actividad promedio [μmol CO ₂ /(min*mg proteína)]	CV
Marca NaH ¹⁴ CO ₃	0	0	0	455406	0.6		
Hoja 2	1	1.49	4	21998	0.029	0.469 ± 0.025	5.3%
	2	1.67	4	22899	0.030		
Hoja 5	1	1.29	3	18237	0.024	0.538 ± 0.084	15.7%
	2	1.15	3	11871	0.016		
	3	1.23	3	15004	0.020		
Hoja 7	1	2.86	1.5	20935	0.028	0.620 ± 0.038	6.1%
	2	2.37	1.5	15551	0.020		
	3	3.11	1.5	22674	0.030		

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.05412	2	0.02706
INTRA HOJAS	0.00331	5	0.00066
TOTAL	0.05412	7	

	HOJA 2 (WSD 0.07738)	HOJA 5 (WSD 0.06921)
HOJA 7	0.1883	0.1416
HOJA 5	0.0467	

Tabla 17 Análisis de Varianza (ANOVA) y tabla de diferencias de la Actividad inicial y total de la Rubisco, medida *in vitro* en las diferentes hojas de cebada. El valor WSD calculado al 95% de confianza para la comparación de los datos se muestra entre paréntesis, hay dos valores debido a que el tamaño de muestra es diferente entre hojas.

ANÁLISIS DE VARIANZA. ACTIVIDAD TOTAL DE LA RUBISCO			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.04556	2	0.02283
INTRA HOJAS	0.01767	5	0.00353
TOTAL	0.04566	7	

TABLA DE DIFERENCIAS		
	HOJA 2 (WSD 0.1788)	HOJA 5 (WSD 0.1599)
HOJA 7	0.1503	0.0817
HOJA 5	0.0686	

13.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CLOROFILA

Tabla 18. Tabla resumen del contenido de clorofila en hojas de cebada calculado conforme a lo propuesto por Porra, et al. (1989). * No se contó con muestra para el triplicado.

	HOJA 2			HOJA 5			HOJA 7		
Réplica biológica	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Clorofila a (Chl a)									
µg/mg de hoja	0.859	0.807	0.838	1.056	0.867	*	1.956	1.706	1.883
promedio	0.835 ± 0.026			0.962 ± 0.134			1.84 ± 0.129		
cv%	3.11%			6.19%			6.96%		
Clorofila b (Chl b)									
µg/mg de hoja	0.173	0.196	0.187	0.245	0.179	*	0.468	0.410	0.426
promedio	0.185 ± 0.011			0.212 ± 0.047			0.435 ± 0.030		
cv%	6.19%			22.08%			6.92%		
Clorofila total (Chl total)									
µg/mg de hoja	1.03	1.00	1.03	1.30	1.05	*	2.42	2.12	2.31
promedio	1.02 ± 0.015			1.17 ± 0.180			2.28 ± 0.156		
cv%	1.48%			15.37%			6.83%		
Clorofila a/Clorofila b (Chl a/Chl b)									
µg/mg de hoja	5.1	4.1	4.4	4.4	4.8	*	4.2	4.2	4.4
promedio	4.50 ± 0.51			4.54 ± 0.28			4.25 ± 0.11		
cv%	11.40%			6.23%			2.72%		

Tabla 19 Análisis de Varianza (ANOVA) y tabla de diferencias de la cantidad de clorofila *a* y *b* en las diferentes hojas de cebada. El valor WSD calculado al 95% de confianza para la comparación de los datos se muestra entre paréntesis, hay dos valores debido a que el tamaño de muestra es diferente entre hojas.

ANÁLISIS DE VARIANZA. CLOROFILA <i>a</i>			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	1.8103	2	0.90514
INTRA HOJAS	0.05231	5	0.01046
TOTAL	1.8103	7	

TABLA DE DIFERENCIAS		
	HOJA 2 (WSD 0.30767)	HOJA 5 (WSD 0.27520)
HOJA 7	1.0138	0.88667
HOJA 5	0.12711	

ANÁLISIS DE VARIANZA. CLOROFILA <i>b</i>			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.11202	2	0.056012
INTRA HOJAS	0.00426	5	0.000851
TOTAL	0.11202	7	

TABLA DE DIFERENCIAS		
	HOJA 2 (WSD 0.08777)	HOJA 5 (WSD 0.07851)
HOJA 7	0.2494	0.2230
HOJA 5	0.0264	

Tabla 20 Análisis de Varianza (ANOVA) y tabla de diferencias de cantidad total y relativa de clorofila en las diferentes hojas de cebada. El valor WSD calculado al 95% de confianza para la comparación de los datos se muestra entre paréntesis, hay dos valores debido a que el tamaño de muestra es diferente entre hojas.

ANÁLISIS DE VARIANZA. CLOROFILA TOTAL			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	2.81765	2	1.4088
INTRA HOJAS	0.08153	5	0.01631
TOTAL	2.81765	7	

TABLA DE DIFERENCIAS		
	HOJA 2 (WSD 0.38410)	HOJA 5 (WSD 0.34355)
HOJA 7	1.26314	1.10966
HOJA 5	0.15347	

ANÁLISIS DE VARIANZA. CLOROFILA <i>a</i> /CLOROFILA <i>b</i>			
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Varianza estimada
ENTRE HOJAS	0.70759	2	0.35380
INTRA HOJAS	0.54262	5	0.10852
TOTAL	0.70759	7	

TABLA DE DIFERENCIAS		
	HOJA 2 (WSD 0.9909)	HOJA 5 (WSD 0.8863)
HOJA 7	0.2663	0.3308
HOJA 5	0.0645	

14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbad, H., El Jaafari, S., Bort, J., & Araus, J. (2004). Comparison of flag leaf and ear photosynthesis with biomass and grain yield of durum wheat under various water conditions and genotypes. *Agronomie*, 24, 19-28.
- Ainsworth, E., & Long, S. (2005). What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *165*, 351-372.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell, chloroplasts and photosynthesis* (4a ed.). New York: Garland Science.
- Almeraya, E. (2005). *Tesis de licenciatura: Expresión de Rubisco activasa y su relación con la productividad del grano de maíz*. UNAM, Facultad de Química.
- Andersson, I., & Backlund, A. (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 275-291.
- Aschan, G., & Pfanz, H. (2003). Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. *Flora*, 198, 81-97.
- Australian Government. (Abril de 2008). *Office of the gene technology regulator*. Recuperado el 21 de Junio de 2016, de The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley): <http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/biologybarley-toc>
- Avramov, S., Pemac, D., & Tucić, B. (2007). Phenotypic plasticity in response to an irradiance gradient in *Iris pumila*: Adaptive value and evolutionary constraints. *Plant Ecology*, 190, 275-290.
- Ayala-Ochoa, A., Vargas-Suárez, M., Loza-Tavera, H., León, P., Jiménez-García, L., & Sánchez-de-Jiménez, E. (2004). In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. *Biochimie*, 86, 439–449.
- Berg, J; Tymoczko, J; Stryer, L;. (2002). *Biochemistry* (5th edition ed.). New York: W. H. Freeman and Company and Sumanas, Inc.
- Biggs, W. (2004). *Principles of radiation measurement*. (LI-COR, Ed.) Recuperado el 29 de Septiembre de 2017, de https://www.licor.com/env/pdf/light/Rad_Meas.pdf
- Bilgin, D., Zavala, J., Zhu, J., Clough, S., Ort, D., & DeLucía, E. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell and Environment*, 33, 1597-1613.
- Bingham, I., Blake, J., Foulkes, M., & Spink, J. (2007). Is barley yield in the UK sink limited?: II. Factors affecting potential grain size. *Field Crops Research*, 101, 212-220.
- Blankenship, R. (2002). *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Blackwell Science.
- Bogdanović, M., Dragičević, M., Tanić, N., Todorović, S., Mišić, D., Živković, S., Tissier, A., Simonović, A. (2013). Reverse transcription of 18S rRNA with poly(dT)18 and other homopolymers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 55-63.
- Bojović, B., Stojanović, J. (2005). Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Archives of Biological Sciences*, 57, 283-290.

- Bracher, A., Whitney, S., Hartl, F., & Hayer-Hartl, M. (2017). Biogenesis and metabolic maintenance of Rubisco. *Annual Review of Plant Biology*, *68*, 29-60.
- Buchanan, B. (2016). The carbon (formerly dark) reactions of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, *128*, 215-217.
- Buttery, B., & Buzzell, R. (1977). The relationship between chlorophyll content and rate of photosynthesis in soybeans. *Canadian Journal of Plant Science*, *57*, 1-5.
- Cantero-Martínez, C., Angas, P., & Lampurlanés, J. (2003). Growth, yield and water productivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) affected by tillage and N fertilization in mediterranean semiarid, rainfed conditions of Spain. *Field Crops Research*, *84*, 341-357.
- Carmo-Silva, E., & Salvucci, M. (2013). The regulatory properties of Rubisco activase differ among species and affect photosynthetic induction during light transitions. *Plant Physiology*, *161*, 1645–1655.
- Carmo-Silva, E., Scales, J., Madgwick, P., & Parry, M. (2015). Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency. *Plant, Cell and Environment*, *38*, 1817–1832.
- Chao, M., Yin, Z., Hao, D., Zhang, J., Song, H., Ning, A., Xu, X., Yu, D. (2014). Variation in Rubisco activase (RCA β) gene promoters and expression in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 47-59.
- Chapin, F., Walter, C., & Clarkson, D. (1988). Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis. *Planta*, *173*, 352-366.
- Chen, Y., Wang, X., Zhou, L., He, Y., Wang, D., Qi, Y., & Jiang, D. (2015). Rubisco activase is also a multiple responder to abiotic stresses in rice. *Plos One*, *10*, 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0140934
- Colwell, K. (15 de Mayo de 2008). *Structure and catalytic activity of the oxygen-evolving complex of photosystem II*. Recuperado el 24 de Marzo de 2017, de <http://www.quantum-immortal.net/physics/177paper.pdf>
- Cox, N., Pantazis, D., Neese, F., & Lubitz, W. (2015). Artificial photosynthesis: understanding water splitting in nature. *Interface Focus*, *5*, 20150009. doi:http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2015.0009
- Crafts-Brandner, S., Van de Loo, F., & Salvucci, M. (1997). The two forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase differ in sensitivity to elevated temperature. *Plant Physiology*, *114*, 439-444.
- Cramer, G., & Nowak, R. (1992). Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt-stressed barley. *Physiologia Plantarum*, *84*, 600-605.
- Dai, Z., Ku, M., & Edwards, G. (1993). C₄ photosynthesis: The CO₂-concentrating mechanism and photorespiration. *Plant Physiology*, *103*, 83-90.
- DaMatta, F., Grandis, A., Arenque, B., & Buckeridge, M. (2010). Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, *43*, 1814–1823.
- DeRidder, B., & Salvucci, M. (2007). Modulation of Rubisco activase gene expression during heat stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involves post-transcriptional mechanisms. *Plant Science*, *172*, 246-254.
- DeRidder, B., Shybut, M., Dyle, M., Kremling, K., & Shapiro, M. (2012). Changes at the 3'-untranslated region stabilize Rubisco activase transcript levels during heat stress in Arabidopsis. *Planta*, *236*, 463–476.

- Derner, J., Johnson, H., Kimball, B., Pinter, P., Polley, H., Tischler, C., Boutton, T., Lamorte, R., Wall, G., Adam, N., Leavitt, S., Ottman, N., Matthias, A., Brooks, T. (2003). Above- and below-ground responses of C₃-C₄ species mixtures to elevated CO₂ and soil water availability. *Global Change Biology*, 9, 452-460.
- Deryng, D., Elliott, J., Folberth, C., Müller, C., Pugh, T., Boote, K., Conway, D., Ruane, A., Gerten, D., Jones, J., Khabarov, N., Olin, S., Schaphoff, S., Schmid, E., Yang, H., Rosenzweig, C. (2016). Regional disparities in the beneficial effects of rising CO₂ concentrations on crop water productivity. *Nature climate change*, 6, 786-793.
- El-Tayeb, M. (2005). Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45, 215-224.
- Evans, L., & Dunstone, R. (1970). Some physiological aspects of evolution in wheat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 23, 725-741.
- FAO. (1994). *Definition and classification of commodities*. Obtenido de Cereals and cereal products: <http://www.fao.org/es/faodef/fdef01e.htm>
- FAO. (1998). *Mapa indicativo de la brecha alimentaria entre los países ricos y los pobres*. Recuperado el 27 de julio de 2016, de <http://www.fao.org/Noticias/1998/981204-s.htm>
- FAO. (2003). *Perfiles Nutricionales por Países - México*. Recuperado el 27 de julio de 2016, de <ftp://ftp.fao.org/es/esn/nutrition/ncp/mexmap.pdf>
- FAO. (2014). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Recuperado el 25 de Agosto de 2017, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Farquhar, G., von Caemmerer, S., & Berry, J. (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation. *Planta*, 149, 78-90.
- Fatehi, F., Hosseinzadeh, A., Alizadeh, H., Brimavandi, T., & Struik, P. (2012). The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. *Molecular Biology Reports*, 39, 6387-6397.
- Fayez, K., & Bazaid, S. (2014). Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13, 45-55.
- Feekes, W. (1941). *De Tarwe en haar milieu* (Vol. XVII). Tarwe Comm. Groningen
- FIRO. (4 de diciembre de 2013). *Red de valor: cebada maltera del estado de Hidalgo*. (G. Armendariz Ramírez, Editor) Recuperado el 15 de julio de 2016, de <https://www.fira.gob.mx/OportunidadNeg/DetalleOportunida.jsp?Detalle=33>
- Fischer, R., Rees, D., Sayre, K., Lu, Z., Condon, A., & Saavedra, A. (1998). Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies. *Crop Science*, 38, 1467-1475.
- Formighieri, C. (2015). Downstream biochemical reactions: Carbon assimilation. En *Solar-to-fuel conversion in algae and cyanobacteria* (págs. 59-63). Switzerland: Springer International Publishing.
- Fukayama, H., Ueguchi, C., Nishikawa, K., Katoh, N., Ishikawa, C., Masumoto, C., Hatanaka, T., Misoo, S. (2012). Overexpression of Rubisco activase decreases the photosynthetic CO₂ assimilation rate by reducing Rubisco content in rice leaves. *Plant and cell Physiology*, 53, 976-986.
- Gest, H. (1993). History of concepts of the comparative biochemistry of oxygenic and anoxygenic photosyntheses. *Photosynthesis Research*, 35, 87 - 96.

- Govindjee, Kern, J., Messinger, J., & Whitmarsh, J. (2010). Photosystem II. En *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* (págs. 1-13). John Wiley y Sons. doi:10.1002/9780470015902.a0000669.pub2
- Habibi, G. (2012). Exogenous salicylic acid alleviates oxidative damage of barley plants under drought stress. *Acta Biologica Szegediensis*, 56, 57-63.
- Harmer, S., Hogenesch, J., Straume, M., Chang, H., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J., Kay, S. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*, 290, 2110-2113.
- Hassham, J., Henson, A., Kay, L., Harris, A., Wilson, A., & Calvin, M. (1954). The path of carbon in photosynthesis. XXI. The cyclic regeneration of carbon. *Journal of the American Chemical Society*, 76, 1760-1770.
- Havaux, M., & Tardy, F. (1999). Loss of chlorophyll with limited reduction of photosynthesis as an adaptive response of Syrian barley landraces to high-light and heat stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 569-578.
- Hazra, S., Henderson, J., Liles, K., Hilton, M., & Wachter, R. (2015). Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase product inhibition, cooperativity, and magnesium activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 24222–24236.
- He, D., & Edwards, G. (1996). Estimation of diffusive resistance of bundle sheath cells to CO₂ from modeling of C₄ photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 49, 195-208.
- Heldt, H., & Piechulla, B. (2011). The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation. En *In Plant Biochemistry* (4 ed., págs. 163-191). San Diego: Academic Press.
- Hermannsson, J., Kristjansdottir, T., Stefansson, T., & Hallsson, J. (2010). Measuring gene flow in barley fields under Icelandic sub-arctic conditions using closed-flowering varieties. *Icelandic Agricultural Sciences*, 23, 51-59.
- IAASTD. (2009). *International assessment of agricultural knowledge, science, and technology for development global report*. Washington, DC: Island Press.
- IPCC. (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. (R. P. Meyer, Ed.) Recuperado el 30 de junio de 2016, de http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_wcover.pdf
- Ishijima, S., Uchibori, A., Takagi, H., Maki, R., & Ohnishi, M. (2003). Light-induced increase in free Mg²⁺ concentration in spinach chloroplasts: Measurement of free Mg²⁺ by using a fluorescent probe and necessity of stromal alkalization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 126-132.
- Jenjins, G., Baker, N., & Woolhouse, H. (1981). Changes in chlorophyll content and organization during senescence of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to photosynthetic electron transport. *Journal of Experimental Botany*, 32, 1009-1020.
- Jensen, P., Bassi, R., Boekema, E., Dekker, J., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H. (2007). Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 335-352.
- Jiang, Y., Wang, J., Tao, X., & Zhang, Y. (2013). Characterization and expression of Rubisco activase genes in *Ipomoea batatas*. *Molecular Biology Reports*, 40, 6309-6321.

- Jinwen, L., Jingping, Y., Pinpin, F., Junlan, S., Dongsheng, L., Changshui, G., & Wenyue, C. (2009). Responses of rice leaf thickness, SPAD readings and chlorophyll a/b ratios to different nitrogen supply rates in paddy field. *Field Crops Research*, 114, 426-432.
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos* (6ta ed.). México: McGraw Hill.
- Kausar, R., Arshad, M., Shahzad, A., & Komatsu, S. (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids*, 44, 345-359.
- Kiirats, O., Lea, P., Franceschi, V., & Edwards, G. (2002). Bundle Sheath diffusive resistance to CO₂ and effectiveness of C₄ photosynthesis and refixation of photorespired CO₂ in a C₄ cycle mutant and wild-type *Amaranthus edulis*. *Plant Physiology*, 130, 964-976.
- Kitajima, K., & Hogan, K. (2003). Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell and Environment*, 26, 857-865.
- Knight, S., Andersson, I., & Brändén, C.-I. (1990). Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution, subunit interactions and active site. *Journal of Molecular Biology*, 215, 113-160.
- Kohl, S., Hollman, J., Erban, A., Kopka, J., Riewe, D., Weschke, W., & Weber, H. (2015). Metabolic and transcriptional transitions in barley glumes reveal a role as transitory resource buffers during endosperm filling. *Journal of Experimental Botany*, 66, 1397–1411.
- Kubien, D., Brown, C., & Kane, H. (2010). Quantifying the amount and activity of Rubisco in leaves. *Methods in Molecular Biology*, 684, 349–362.
- Large, E. (1954). Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. *Plant Pathology*, 3, 128-129.
- Law, D., & Crafts-Brandner, S. (2001). High temperature stress increases the expression of wheat leaf ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386, 261–267.
- Law, R., Crafts-Brandner, S., & Salvucci, M. (2001). Heat stress induces the synthesis of a new form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in cotton leaves. *Planta*, 214, 117-125.
- Lefebvre, S., Lawson, T., Fryer, M., Zakhleniuk, O., Lloyd, J., & Raines, C. (2005). Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiology*, 138, 451-460.
- Leitao, L., Maoret, J., & Biolley, J. (2007). Changes in PEP carboxylase, Rubisco and Rubisco activase mRNA levels from maize (*Zea mays*) exposed to a chronic ozone stress. *Biological Research*, 40, 137-153.
- Lilley, R., & Portis, A. (1990). Activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) by Rubisco activase: Effects of some sugar phosphates. *Plant Physiology*, 94, 245-250.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major lightharvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428, 287-292.
- Long, S., Ainsworth, E., Leakey, A., Nösberger, J., & Ort, D. (2006). Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science*, 312(5782), 1918-1921.
- Lopes, M., Nogués, S., & Araus, J. (2004). Nitrogen source and water regime effects on barley photosynthesis and isotope signature. *Functional Plant Biology*, 31, 995-1003.

- Ludwig, M. (2016). The roles of organic acids in C₄ photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 7(647).
- Martínez-Barajas, E., Molina-Galán, J., & Sánchez de Jiménez, E. (1997). Regulation of Rubisco activity during grain-fill in maize: possible role of Rubisco Activase. *The Journal of Agricultural Science*, 128, 155-161.
- Martino-Catt, S., & Ort, D. (1992). Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 3731-3735.
- Masumoto, C., Fukayama, H., Hatanaka, T., & Uchida, N. (2012). Photosynthetic characteristics of antisense transgenic rice expressing reduced levels of Rubisco activase. *Plant Production Science*, 15, 174-182.
- Mazor, Y., Borovikova, A., Caspy, I., & Nelson, N. (2017). Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nature Plants*, 3, 1-9.
- McNevin, D., von Caemmerer, S., & Farquhar, G. (2006). Determining RuBisCO activation and equilibrium constants by simultaneous multiple non-linear regression of a kinetic model. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3883–3900.
- Morales, A., Ortega-Delgado, M., Molina-Galán, J., & Sánchez-de-Jiménez, E. (1999). Importance of Rubisco Activase in maize productivity based on mass selection procedure. *Journal of Experimental Botany*, 50, 823–829.
- Mur, L., Aubry, S., Mondhe, M., Kingston-Smith, A., Gallagher, J., Timms-Taravella, E., James, C., Papp, I., Hörtensteiner, S., Thomas, H., Ougham, H. (2010). Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 188, 161-174.
- Nelson, N., & Junge, W. (2015). Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 659-683.
- Nelson, N., & Yocum, C. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 521-565.
- Neuwald, A., Aravind, L., Spouge, J., & Koonin, E. (1999). AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Research*, 9(1), 27-43.
- Niinemets, Ü., Díaz-Espejo, A., Flexas, J., Galme's, J., & Warren, C. (2009). Role of mesophyll diffusion conductance in constraining potential photosynthetic productivity in the field. *Journal of Experimental Botany*, 60(8), 2249–2270.
- Nikkanen, L., & Rintamäki, E. (2014). Thioredoxin-dependent regulatory networks in chloroplasts under fluctuating light conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 369:, 20130224.
- Noordally, Z., Ishii, K., Atkins, K., Wetherill, S., Kusakina, J., Walton, E., Kato, M., Azuma, M., Tanaka, K., Hanaoka, M., Dodd, A. (2013). Circadian Control of Chloroplast Transcription by a Nuclear-Encoded Timing Signal. 339, 1316-1319.
- Ogura, T., & Wilkinson, A. (2001). AAA+ Superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes to cells*, 6, 575-597.
- Ozturk, Z., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C., Galbraith, D., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., Bohnert, H. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology*, 48, 551-573.

- Park, S., Chung, P., Juntawong, P., Bailey-Serres, J., Kim, J., Jung, H., Bang, S., Kim, Y., Choi, Y., Kim, J. (2012). Posttranscriptional control of photosynthetic mRNA decay under stress conditions requires 3' and 5' untranslated regions and correlates with differential polysome association in rice. *Plant Physiology*, *159*, 111-1124.
- Parry, M., Keys, A., Madgwick, P., Carmo-Silva, A., & Andralojc, P. (2008). Rubisco regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany*, *59*, 1569-1580.
- Parry, M., Rosenzweig, C., Iglesias, A., Livermore, M., & Fischere, G. (2004). Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios. *Global Environmental Change*, *14*, 53-67.
- Pelloux, J., Jolivet, Y., Fontaine, V., Banvoy, J., & Dizengremel, P. (2001). Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant, cell and environment*, *24*, 123-131.
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, N., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoglu, S., & Kreuzaler, F. (2010). Photorespiration. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, *8*. doi:10.1199/tab.0130
- Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, *975*, 384-394.
- Portis, A. (1995). The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Journal of Experimental Botany*, *46*, 1285-1291.
- Quian, J., & Roderick, S. (1993). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase cDNAs from *Nicotiana glauca*. *Plant physiology*, *102*, 683-684.
- Ristic, Z., Momcilovic, I., Bukovnik, U., Prasad, P., Fu, J., DeRidder, B., Elthon, P., Mladenov, N. (2009). Rubisco activase and wheat productivity under heat-stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, *60*, 4003-4014.
- Robinson, S., & Portis, A. (1989). Adenosine Triphosphate Hydrolysis by Purified Rubisco Activase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *268*(1), 93-99.
- Robredo, A., Pérez-López, U., Sainz, H., González-Moro, B., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., & Muñoz-Rueda, A. (2007). Elevated CO₂ alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance and delaying its effects on photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, *59*, 252-263.
- Rogers, A., Ellsworth, D. S., & Humphries, S. W. (2001). Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO₂. *Journal of Experimental Botany*, *52*, 1555-1561.
- Rollins, J., Habte, E., Templer, S., Colby, T., Schmidt, J., & von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, *64*, 3201-3212.
- Rundle, S., & Zielinski, R. (1991a). Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in barley. *Journal of Biological Chemistry*, *266*, 4677-4685.

- Rundle, S., & Zielinsky, R. (1991b). Alterations in Barley ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase gene expression during development and in response to illumination. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 14802-14807.
- SAGARPA. (14 de Mayo de 2017). *Aumenta 33 por ciento producción de cebada en México*. Recuperado el 25 de Agosto de 2017, de http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_00174_14.aspx
- Saisho, D., & Takeda, K. (2011). Barley: emergence as a new research material of crop science. *Plant and cell physiology*, 52, 724-727.
- Salekdeh, G., Siopongco, J., Wade, L., Ghareyazie, B., & Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2, 1131–1145.
- Salvucci, M., van de Loo, F., & Stecher, D. (2003). Two isoforms of Rubisco activase in cotton, the products of separate genes not alternative splicing. *Planta*, 216, 736-744.
- Samarah, N. (2005). Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development*, 25, 145-149.
- Sánchez de Jiménez, E., Medrano, L., & Martínez-Barajas, E. (1995). Rubisco Activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry*, 34, 2826-2831.
- Schmid, V. (2008). Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell molecular Life Science*, 65, 3619 – 3639.
- Serna, S. (2001). *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. DF, México: A. G. T. Editor, S.S.
- Sharkey, T. (2001). Photorespiration. En *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* (págs. 1-5). John Wiley y Sons.
- SIAP. (2014). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Recuperado el 21 de Junio de 2016, de Anuario Estadístico de la Producción Agrícola: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
- Simmons, S., Oelke, E., & Anderson, P. (1995). Growth and development guide for spring barley. (U. o. Minnesota, Ed.) *F0-2548-D*, 1-8. Obtenido de <https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/165839/Growth%20and%20Development%20Guide%20for%20Spring%20Barley.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., & Demirevska-Kepova, K. (2001). Ontogenic changes in leaf pigments, total soluble protein and Rubisco in two barley varieties in relation to yield. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27, 15-24.
- Spreitzer, R., & Salvucci, M. (2002). Rubisco: Interactions, associations and the possibilities of a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 449–475.
- Stotz, M., Mueller-Cajar, O., Ciniawsky, S., Wendler, P., Ulrich, H., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Structure of green-type Rubisco activase from tobacco. *Nature Structural y Molecular Biology*, 18, 1366 - 1371.
- Streusand, V., & Portis, A. (1987). Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, 85, 152-154.
- Sujatha, B. (2015). Photosynthesis. En *Plant Biology and Biotechnology* (págs. 569-591). Springer India.
- Tambussi, E., Bort, J., Guiamet, J., Nogués, S., & Araus, J. (2007). The photosynthetic role of ears in C3 cereals: metabolism, water use efficiency and contribution to grain yield. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26, 1-16.

- Taub, D., & Wang, X. (2008). Why are nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO₂? A critical examination of the hypotheses. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*, 1365-1374.
- Tottman, D., & Broad, H. (1987). The decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Biology*, *110*, 441-454.
- Trebst, A., Tsujimoto, H., & Arnon, D. (1958). Separation of light and dark phases in photosynthesis of isolated chloroplasts. *Nature*, *182*, 351-355.
- Vargas-Suárez, M., Ayala-Ochoa, A., Lozano-Franco, J., García-Torres, I., Díaz-Quiñonez, A., Ortiz-Navarrete, V., & Sánchez-de-Jiménez, E. (2004). Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, *55*, 2533-2539.
- Volk, W. (1958). *Applied statistics for engineers*. United States of America: McGraw-Hill.
- Wachter, R., & Henderson, J. (2015). Photosynthesis: Rubisco rescue. *Nature Plants*, *1*, 1-2.
- Wahid, A., & Shabbir, A. (2005). Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regulation*, *46*, 133-141.
- Walker, B., VanLoocke, A., Bernacchi, C., & Ort, D. (2016). The costs of photorespiration to food production now and in the future. *Annual Review in Plant Biology*, *67*, 107-129.
- Wang, D., & Portis, A. (2006). Increased sensitivity of oxidized large isoform of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase to ADP inhibition is due to an interaction between its carboxyl extension and nucleotide-binding pocket. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*, 25241-25249.
- Wang, D., Li, X., Zhou, Z., Feng, X., Yang, W., & Jiang, D. (2010). Two Rubisco activase isoforms may play different roles in photosynthetic heat acclimation in the rice plant. *Physiologia Plantarum*, *139*, 55-67.
- Wang, D., Lu, Q., Li, X., Juang, Q., Wu, J., & Jiang, D. (2009). Relationship between Rubisco activase isoform levels and photosynthetic rate in different leaf positions of rice plant. *Photosynthetica*, *47*, 621-629.
- Wang, Z., & Portis, A. (1992). Dissociation of ribulose-1,5-bisphosphate bound to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its enhancement by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase-mediated hydrolysis of ATP. *Plant Physiology*, *99*, 1348-1353.
- Waugh, R., Bull, H., & Swirek, M. (25 de Octubre de 2013). *International Barley Hub*. (T. J. Institute, Editor) Recuperado el 19 de junio de 2016, de <http://www.barleyhub.org/projects/row-genes/>
- Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., Zhang, X., Liu, Z. (2016). Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature*, *534*, 69-74.
- Werneke, J., Chatfield, J., & Ogren, W. (1989). Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and Arabidopsis. *The Plant Cell*, *1*, 815-825.
- Werneke, J., Zielinski, R., & Ogren, W. (1988). Structure and expression of spinach leaf cDNA encoding ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, 787-791.
- Wu, H., Ding, Z., Li, L., Jing, X., & Kuang, T. (2006). Expression of the large isoform of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase gene driven by RBCs promoter in *Oryza sativa* enhances the photosynthetic capacity. *Photosynthetica*, *44*, 208-214.

- Yamaoka, C., Suzuki, Y., & Makino, A. (2016). Differential expression of genes of the Calvin–Benson cycle and its related genes during leaf development in rice. *Plant and Cell Physiology*, *57*, 115-124.
- Yamori, W., & von Caemmerer, S. (2009). Effect of Rubisco activase deficiency on the temperature response of CO₂ assimilation rate and Rubisco activation state: insights from transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco activase. *Plant Physiology*, *15*, 2073–2082.
- Yamori, W., Masumoto, C., Fukayama, H., & Makino, A. (2012). Rubisco activase is a key regulator of non-steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *The Plant Journal*, *71*, 871-880.
- Yamori, W., Noguchi, K., Hanba, Y., & Terashima, I. (2006). Effects of internal conductance on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. *Plant Cell Physiology*, *47*, 1069–1080.
- Yamori, W., Noguchi, K., Kashino, Y., & Terashima, I. (2008). The role of electron transport in determining the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves grown at contrasting temperatures. *Plant Cell Physiol*, *49*, 583–591.
- Yin, Z., Meng, F., Song, H., Wang, X., Xu, X., & Yu, D. (2010). Expression quantitative trait loci analysis of two genes encoding rubisco activase in soybean. *Plant Physiology*, *152*, 1625-1637.
- Yin, Z., Zhang, Z., Deng, D., Chao, M., Gao, Q., Wang, Y., Yang, A., Bian, Y., Hao, D., Xu, C. (2014). Characterization of Rubisco activase genes in maize: An a-isoform gene functions alongside a b-isoform gene. *Plant Physiology*, *164*, 2096–2106.
- Yongchao, L. (1998). Effect of silicon on leaf ultrastructure, chlorophyll content and photosynthetic activity of barley under salt stress. *Pedosphere*, *8*, 289-296.
- Zadoks, J., Chang, T., & Konzak, C. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, *14*, 415-421.
- Zar, J. (1984). *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall.
- Zhang, N., & Portis, A. (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*, 9438-9443.
- Zhang, N., Schürmann, P., & Portis, A. (2001). Characterization of the regulatory function of the 46-kDa isoform of Rubisco activase from Arabidopsis. *Photosynthesis Research*, *68*, 29-37.
- Zhenqi, L., Zenye, L., Dapeng, M., & Shufen, Z. (1984). A study on the relation between chlorophyll content and photosynthetic rate of rice. *Acta Agronomica Sinica*, *10*, 57-62.
- Zielinski, R., Werneke, J., & Jenkins, M. (1989). Coordinate expression of Rubisco activase and Rubisco during barley leaf cell development. *Plant Physiology*, *90*, 516-521.